

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**PRIORITY
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

EPO-Munich
REC'D 24 NOV 2000 Nov. 2000
WIPO PCT

10/088248

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

4

Aktenzeichen: 199-44-262-2**Anmeldestag:** 15. September 1999**Anmelder/Inhaber:** Cardiogene Gentherapeutische Systeme AG,
Erkrath/DE**Bezeichnung:** Pharmazeutische Zusammensetzungen in Form
eines Nukleinsäure-Lipid-Komplexes, ihre Herstellung
und Verwendung in der Gentherapie**IPC:** A 61 K 48/00

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der
ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 12. September 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
 Im Auftrag

Ebert

5

Pharmazeutische Zusammensetzung in Form eines Nukleinsäure-Lipid-Komplexes, ihre Herstellung und Verwendung in der Gentherapie

- 10 Die vorliegende Erfindung betrifft eine pharmazeutische Zusammensetzung in Form eines Nukleinsäure-Lipid-Komplexes enthaltend mindestens ein kationisches Lipid, mindestens ein nicht-kationisches Lipid, mindestens eine Nukleinsäure kodierend für ein Protein zur Behandlung von Gefäßkrankheiten, insbesondere ein Protein mit gefäßerweiternden und/oder gefäßbildenden 15 Eigenschaften, und gegebenenfalls geeignete Hilfs- und/oder Zusatzstoffe, wobei das kationische Lipid (KL) eine von Cholesterin abgeleitete Gruppe enthält, an der über eine Verbindungsgruppe, ausgewählt aus Carboxamiden und Carbamoylen, und einen Spacer bestehend aus einer linearen oder verzweigten Alkylgruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen mindestens eine kationische 20 Aminogruppe, ausgewählt aus primärer, sekundärer, tertiärer Aminogruppe und/oder einem quartären Ammoniumsalz, gebunden ist, und wobei die Größe der Nukleinsäure-Lipid-Komplexe in einem Bereich von ca. 300-800 nm liegt. Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung die Herstellung der pharmazeutischen Zusammensetzung und ihre Verwendung in der Gentherapie.
- 25 Es sind bereits eine Reihe von pharmazeutischen Zusammensetzungen in Form eines Nukleinsäure-Lipid-Komplexes entwickelt worden, die ein kationisches Lipid und eine Nukleinsäure sowie gegebenenfalls weitere Hilfs- und/oder Zusatzstoffe enthalten.
- 30 Reszka (WO 96/20208 und DE 196 23 916) entwickelte das kationische Cholesterinderivat 3β -[N-(N,N'-Dimethylaminoethan)-carbamoyl]cholesterin

(DAC-Chol) und beschrieb seine Verwendung für den direkten liposomalen Gentransfer in vivo. Bei der Herstellung der beschriebenen Liposomen wurde DAC-Chol mit Dioleylphosphatidylethanolamin (DOPE) als Helferlipid in einem molaren Verhältnis von 3:2 verwendet. Epand, R.M. et al. (US 5,283,185) beschrieben ein Verfahren zur Übertragung von Nukleinsäuren in Zellen unter Verwendung von kationischen Lipiden mit Proteinkinase C-inhibitorischen Eigenschaften, insbesondere des kationischen Lipids 3β -[N-(N',N'-Dimethylaminoethan)-carbamoyl]-cholesterin (DC-Chol), und einem Co-Lipid wie DOPE. Ein Säureadditionssalz von DC-Chol und seine Verwendung zur Transfektion von tierischen Zellen mittels eines liposomalen Systems wurde ebenfalls beschrieben (US 5,753,262). Des weiteren wurden amphipatische Vehikel, die Polyamin-Cholesterin-Konjugate umfassen, für die Übertragung von Nukleinsäuren in Zellen, z.B. bei der Gentherapie, vorgeschlagen (US 5,614,503). Eine liposomale Zusammensetzung für die Übertragung eines DNA-Moleküls, die ein kationisches Lipid zusammen mit einem neutralen Co-Lipid umfaßt, wurde beschrieben, bei der die Liposomen eine Größe von ca. 800 nm besitzen (WO 98/17814). Komplexe aus Nukleinsäure und kationischen Liposomen wurden auch zur Erzielung einer organspezifischen Genexpression bei einem Säugetier vorgeschlagen (US 5,676,954). Szoka, F.C. et al. (US 5,811,406) entwickelten ein Transfektionsverfahren unter Verwendung eines Lipid-Polynukleotid-Komplexes, der durch Zugabe einer kryoprotektiven Verbindung stabilisiert wurde und anschließend lyophilisiert wurde. Die lyophilisierten Komplexe wurden direkt ohne Rekonstituierung zur Transfektion eingesetzt. Sorgi, F.L. und Huang, L. (WO 96/27393) beschrieben eine Trockenpulver-Formulierung, die einen lyophilisierten Nukleinsäure-Liposomen-Komplex enthielt. Der lyophilisierte Komplex kann nach Rekonstituierung als ein Aerosol zur Gentübertragung in vitro und in vivo eingesetzt werden. Insbesondere wurden DC-Chol und DOPE als Lipide, wahlweise mit einem Zucker als kryoprotektiver Verbindung, eingesetzt. Bischoff, R. (WO 98/08489) beschrieb Lipid-Nukleinsäure-Komplexe, die ein kationisches Lipid (z.B. DC-Chol), ein Co-Lipid (z.B. DOPE), einen stabilisierenden Zusatzstoff (PEG und Derivate davon) und eine Nukleinsäure

enthielten. Die entstehenden Partikel besaßen eine Größe von 500 nm oder weniger. Des weiteren schlugen Marshall, J. et al. (WO 98/13026) eine Zusammensetzung vor, die ein kationisches amphiphiles Molekül, ein Nukleinsäuremolekül und vorzugsweise ein Co-Lipid, umfaßt. Schließlich

5 beschrieben Debs, R.J. und Zhu, N. (US 5,827,703) einen liposomalen Komplex zur systemischen Einführung von Erbmaterial in ein Säugetier, wobei der Komplex ein kationisches Lipid in Verbindung mit Cholesterin als nicht-kationischem Lipid umfaßt.

10 Ein Beispiel für die Herstellung von DNA-Liposomen-Komplexen aus Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin und Cholesterin und deren erfolgreiche Anwendung in der Transfektion von Gefäßwänden mit Hilfe von Sendai-Viren wurde in der DE 44 11 402 beschrieben. Ein Transfektionssystem enthaltend einen Infiltrator-Katheter, eine Nukleinsäure in Form eines Nukleinsäure-15 Liposomen-Komplexes, und ggf. geeignete Hilfs- und/oder Zusatzstoffe und dessen Verwendung zur Behandlung von Gefäßerkrankungen sind aus der DE 197 29 769 bekannt.

Es ist anhand der vorgenannten Dokumente leicht ersichtlich, daß zahlreiche
20 Bemühungen unternommen wurden, um ein möglichst geeignetes Transfektions-
system zur Verwendung in der Gentherapie bereitzustellen. Dies gilt insbesondere
auch für die gentherapeutische Behandlung von Gefäßerkrankheiten, wie
Bluthochdruck, Arteriosklerose, Stenose oder Restenose.

25 Aufgabe der Arbeiten zur vorliegenden Erfindung war es, eine Formulierung und
ein Verfahren für den nicht-viralen Transfer von Nukleinsäuren in vaskuläre
Zellen zu finden, das einen effizienten Transfer des therapeutischen Gens in die
Zielzellen unterstützt, eine lokale Anreicherung eines therapeutischen Proteins in
der Gefäßwand bei größtmöglicher Schonung des umgebenden Gewebes
30 bewerkstelligt und die kommerzielle Herstellung eines Lyophilisats in einer für
den Vertrieb geeigneten Form ermöglicht.

Es wurde nun überraschenderweise gefunden, daß man therapeutische liposomale Formulierungen mit sehr hoher Effizienz lokal in Zellen der Gefäßwand transferieren kann, wenn man Nukleinsäuren mit geeigneten Lipiden und geeigneten Zusatz- und/oder Hilfsstoffen zu Komplexen einer definierten Größe 5 formuliert und diese Komplexe in die Zielzellen der Gefäßwand einbringt.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher eine pharmazeutische Zusammensetzung in Form eines Nukleinsäure-Lipidkomplexes, enthaltend mindestens ein kationisches Lipid, mindestens ein nicht-kationisches Lipid, eine 10 Nukleinsäure, kodierend für ein Protein zur Behandlung von Gefäßkrankheiten, insbesondere ein Protein mit gefäßerweiternden und/oder gefäßbildenden Eigenschaften und ggf. weitere Hilfs- und/oder Zusatzstoffe, wobei das kationische Lipid (KL) eine von Cholesterin abgeleitete, insbesondere lipophile, Gruppe enthält, an der über eine Verbindungsgruppe, ausgewählt aus 15 Carboxamiden und Carbamoylen, und einen Spacer, bestehend aus einer linearen oder verzweigten Alkylgruppe mit 1 bis 20, vorzugsweise 1 bis 10, Kohlenstoffatomen, mindestens eine kationische Aminogruppe, ausgewählt aus primärer, sekundärer, tertiärer Aminogruppe und/oder einem quartären Ammoniumsalz, gebunden ist, und wobei die Größe der Nukleinsäure-Lipid- 20 Komplexe in einem Bereich von ca. 300-800 nm liegt. Besonders gute Ergebnisse lassen sich erzielen, wenn man Nukleinsäure-Lipid-Komplexe mit einer Größe von ca. 350-550 nm für den Gentransfer, insbesondere *in vivo*, einsetzt.

Bei den Nukleinsäure-Lipid-Komplexen handelt es sich üblicherweise um 25 liposomale Komplexe. Im allgemeinen enthalten diese liposomalen Komplexe, insbesondere die Nukleinsäuren, keine viralen Bestandteile. Bei der Nukleinsäure handelt es sich üblicherweise um genomische DNA, cDNA, synthetische DNA, RNA, mRNA, Ribozyme, Antisense-RNA, synthetische Peptidnukleinsäuren und Oligonukleotide, vorzugsweise um eine cDNA. Die Nukleinsäure kann zum 30 Beispiel in Form eines geeigneten DNA-Expressionsvektors verwendet werden (siehe z.B. DE 44 11 402). Bei dem Protein oder Polypeptid, das zur Behandlung

von Gefäßkrankheiten eingesetzt wird, handelt es sich vorzugsweise um eines mit gefäßerweiternden und/oder gefäßbildenden Eigenschaften. Beispiele für Proteine mit gefäßerweiternden Eigenschaften sind die Isoformen der Stickoxidsynthase (NOS) und der Hämoxxygenase (HO), während die Isoformen des Monocyte Chemoattractant Protein (MCP) gefäßbildende Eigenschaften aufweisen. Die Familie der Stickoxidsynthasen umfaßt mindestens drei verschiedene Isoenzyme: Das endotheliale Enzym (eNOS), das neuronale Enzym (nNOS) und die induzierbare NOS (iNOS) (siehe z.B. DE 44 11 402 und DE 197 29 769). Die Familie der Hämoxxygenasen umfaßt ebenfalls mindestens drei Isoenzyme: Die Hämoxxygenase 1 (HO-1), die Hämoxxygenase 2 (HO-2), und die Hämoxxygenase 3 (HO-3) (siehe z.B. Soares, M.P. et al. (1998) Nature Medicine 4, 1073; Hancock, W.W. et al. (1998) Nature Medicine 4, 1392; Yoshida, T. et al. (1988) Eur. J. Biochem. 171, 457; McCoubrey, W.K. Jr et al. (1992) Arch. Biochem. Biophys. 295, 13; McCoubrey, W.K. Jr et al. (1997) Eur. J. Biochem. 247, 725). Zu den Isoformen des Monocyte Chemoattractant Protein gehören unter anderem die folgenden Proteine: MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4 und MCP-5 (siehe z.B. US 5,212,073; US 5,278,287; Ito, W.D. et al. (1997) Circ. Res. 80, 829; Arras, M. (1998) J. Clin. Invest. 101, 40; WO 97/35982 und WO 98/44953). Besonders bevorzugt ist eine Nukleinsäure, die für die induzierbare Stickoxidsynthase (iNOS), die Hämoxxygenase 1 (HO-1), das Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) oder eine Variante davon kodiert, wobei die jeweilige humane Form wiederum besonders bevorzugt ist.

Die iNOS besitzt neben ihrer gefäßerweiternden Wirkung eine antithrombotische und antiproliferative Wirkung. Entzündungsmediatoren wie Endotoxine führen zu der vermehrten Expression dieses Enzyms, das auch als induzierbare Stickoxidsynthase bezeichnet wird (siehe auch DE 44 11 402 und DE 197 29 769). Die Hämoxxygenase-Isoformen HO-1 und HO-2 werden unter anderem im Gefäßsystem exprimiert und bauen Häm zum Gallenfarbstoff Biliverdin ab. Dies geschieht unter Freisetzung von freiem Eisen und Kohlenmonoxid (CO). Letzteres übt, ähnlich wie das von der NOS erzeugte Stickoxid (NO), eine gefäßerweiternde

und antithrombotische Wirkung aus. Obwohl das durch die HO-1 gebildete CO ebenso wie NO die Proliferation glatter Muskelzellen hemmt, induziert HO-1 im Gegensatz zur NOS keinen apoptotischen Zelltod. Die HO-1 ist darüber hinaus in Transplantationsmodellen als entzündungshemmend und immunprotektiv 5 beschrieben worden (Hancock et al., *supra*; und Soares et al., *supra*). Die Isoform 1 des Monocyte Chemoattractant Protein (auch Monocyte Chemotactic Protein-1 oder JE-Cytokin genannt), MCP-1, ist bei der Arteriogenese, d.h. der Bildung von Kollateralgefäßen aus bereits vorhandenen Arteriolen, von Bedeutung. Durch Infusion des MCP-1-Proteins in künstlich induzierte Verschlußstellen der 10 Femoralarterie im Tiermodell Kaninchen (Ito et al., *supra*; Arras et al., *supra*) lässt sich die Bildung von Kollateralgefäßen erzielen, die den Blutfluß in die behandelten Extremitäten wiederherstellen.

Die vorliegende Erfindung umfaßt auch Varianten der vorgenannten Proteine. 15 Unter dem Begriff "Variante" werden hierin Proteine oder Polypeptide verstanden, die eine Sequenzhomologie, insbesondere eine Sequenzidentität von ca. 70%, vorzugsweise von ca. 80%, insbesondere von ca. 90%, vor allem von ca. 95% zu den vorgenannten Proteinen besitzen. Ferner zählen hierzu auch Deletionen des Proteins im Bereich von ca. 1-60, vorzugsweise von ca. 1-30, 20 insbesondere von ca. 1-15, vor allem von ca. 1-5 Aminosäuren. Daneben zählen hierzu auch Fusionsproteine, die die vorgenannten Proteine enthalten. Unter Varianten versteht man auch allelische Varianten, die von anderen Zellen bzw. Geweben abstammen. Auch versteht man darunter Proteine, die von verschiedenen Individuen stammen. Dementsprechend umfaßt die vorliegende 25 Erfindung auch Nukleinsäuren, die für die vorgenannten Proteine oder Polypeptide kodieren. Beispiele derartiger verwandter Nukleinsäuren sind Nukleinsäuren aus unterschiedlichen menschlichen Zellen bzw. Geweben oder allelische Varianten, sowie Nukleinsäuren, die von verschiedenen menschlichen Individuen stammen können. Im weiteren Sinne versteht man unter einer 30 „Variante“ einer Nukleinsäure gemäß der vorliegenden Erfindung eine Nukleinsäure, die eine Homologie, insbesondere eine Sequenzidentität von ca.

- 60%, vorzugsweise ca. 75%, insbesondere von ca. 90% und vor allem von ca. 95% aufweist. Dem Fachmann stehen geeignete Techniken und Verfahren zur Herstellung und Mutagenese von Nukleinsäuren sowie zur Genexpression und Proteinanalyse zur Verfügung (siehe z.B. Sambrook, J. et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Glover, D.M. (1995) DNA cloning: A practical approach, Volume II: Expression systems, IRL Press; Ausubel et al. (1992) Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons; Rees, A.R. et al. (1993) Protein Engineering: A practical approach, IRL Press). Unter dem Ausdruck „mindestens eine Nukleinsäure“ versteht man gemäß der vorliegenden Erfindung, daß die Nukleinsäure-Lipid-Komplexe auch Kombinationen aus mehr als einer Nukleinsäure umfassen können, wobei die Nukleinsäuren sowohl für verschiedene Formen eines therapeutischen Proteins als auch für verschiedene der hierin beschriebenen therapeutischen Proteine kodieren können.
- 15 In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem kationischen Lipid um 3β -[N(N'N'-Dimethylaminoethan)-carbamoyl]cholesterin (siehe z.B. Epand et al., *supra*) oder 3β -[N-(N,N'-Dimethylaminoethan)-carbamoyl]cholesterin (DAC-Chol) (siehe z.B. Reszka, *supra*).
- 20 Bei dem mindestens einen nicht-kationischen Lipid handelt es sich üblicherweise um ein Lipid ausgewählt aus mindestens einem Phosphatidylcholin, mindestens einem Phosphatidylethanolamin und/oder Cholesterin. Vorzugsweise ist das Phosphatidylethanolamin ein Phosphatidylethanolamin mit einer Kettenlänge von 25 10-28 Kohlenstoffatomen, insbesondere Dimyristoylphosphatidylethanolamin (DMPE), Dipalmitoylphosphatidylethanolamin (DPPE) und/oder Dioleylphosphatidyl-ethanolamin (DOPE), wobei DOPE besonders bevorzugt ist.
- 30 Als besonders vorteilhaft stellte sich eine pharmazeutische Zusammensetzung heraus, bei der das kationische Lipid DAC-Chol ist und das nicht-kationische Lipid DOPE ist, vorzugsweise in einem Gewichtsverhältnis von DAC-Chol zu

DOPE von ca. 10:90 bis ca. 90:10, wobei hiermit alle Gewichtsverhältnisse, die zwischen diesen angegebenen Verhältnissen liegen, wie ca. 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30 und 80:20, insbesondere aber auch dazwischenliegende Verhältnisse, wie z.B. 21:79, 22:78, 23:77, 24:76, 25:75, 26:74, 27:73, 28:72, 5 29:71 und 31:69, 32:68, 33:67, 34:66, 35:65, 36:64, 37:63, 38:62 und 39:61, mitumfaßt sind. Besonders bevorzugt ist ein Gewichtsverhältnis vom DAC-Chol zu DOPE von ca. 30:70. Alternativ dazu kann das Verhältnis des kationischen Lipids zum nicht-kationischen Lipid auch als molares Verhältnis ausgedrückt werden.

10

Die erfindungsgemäße Zusammensetzung wird unter Einsatz von Gesamtlipid aus kationischem Lipid und ggf. nicht-kationischem Lipid zu Nukleinsäure im Verhältnis von ca. 1:1 bis ca. 10:1, jeweils bezogen auf das Gewicht, erhalten. Besonders vorteilhaft ist die Verwendung eines Gewichtsverhältnisses von ca. 4:1 15 bis ca. 5:1, bei dem sich *in vivo* eine überraschend gute Transfektionseffizienz ergibt.

Die erfindungsgemäße Zusammensetzung kann als Lösung, insbesondere als eine frisch hergestellte wäßrige Lösung, oder als Lyophilisat, das nach Rekonstituieren 20 eingesetzt werden kann, vorliegen.

Vorzugsweise enthält die erfindungsgemäße Zusammensetzung einen oder mehrere Hilfsstoffe. Besonders bevorzugt ist hierbei ein Mittel, das die Nukleinsäure-Lipid-Komplexe sowohl in unlyophilisierter, als auch lyophilisierter 25 Form stabilisiert. Als Maß für die Stabilität der Komplexe kann die zeitlich konstante Größe dieser Komplexe herangezogen werden. Vorteilhafterweise handelt es sich bei dem stabilisierenden Mittel um mindestens einen Zucker, mindestens ein anorganisches Salz und/oder mindestens einen mehrwertigen Alkohol. In einem weiteren Sinne versteht man hierin unter einem Zucker auch 30 einen Zuckeralkohol wie z.B. Mannit. Ein Beispiel für einen mehrwertigen Alkohol ist Polyethylenglykol (PEG). Die Kombination von Saccharose als

Zucker und NaCl als anorganisches Salz ist besonders bevorzugt. Das nachfolgend vorgeschlagene Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen sieht beispielsweise vor, diese Kombination von Stoffen mittels einer isoosmotischen Lösung in einem geeigneten Verfahrensschritt einzubringen. Dem Fachmann werden angesichts der vorliegenden Beschreibung weitere Möglichkeiten für die Aufnahme des stabilisierenden Mittels ersichtlich sein.

Die erfindungsgemäße Zusammensetzung kann weiterhin mindestens einen Zusatzstoff enthalten. Bevorzugterweise handelt es sich hierbei um mindestens ein spezifisch die Zielzellen erkennendes Molekül und/oder ein den Gentransfer in die Zellen erleichterndes Molekül. Das spezifische Erkennen von Zellen bezeichnet man auch als "Targeting". Für dieses Targeting stehen grundsätzlich mindestens zwei Möglichkeiten zur Verfügung: Zum einen kann man Antikörper gegen Strukturen an der Zelloberfläche wie z.B. Rezeptoren verwenden, die in virale oder liposomale Vektorsysteme integriert sind (Vingerhoeds, H. et al. (1994) Immunmeth 4, 259; Wickham, T.J. et al. (1996) J. Virol. 70, 6831), und zum anderen kann man Peptide mit hoher Bindungsaffinität für Rezeptoren auf der Zelloberfläche verwenden. Demgemäß werden hierin unter dem Begriff "ein spezifisch die Zielzellen erkennendes Molekül" zell- oder gewebespezifisch bindende Antikörper oder Peptide verstanden. Derartige Peptide können als Teile eines Rezeptor-Liganden-Systems bekannt sein oder lassen sich z.B. mittels eines Durchsuchens einer kombinatorischen Peptidbank isolieren (Lu, Z. et al. (1995) Biotechnol. 13, 366; U.S. Patent No. 5,635,182; Koivunen, E. et al. (1999) J. Nucl. Med. 40, 883). Neben den beschriebenen Peptiden sind eine Reihe weiterer Moleküle denkbar, die ebenfalls zur spezifischen Erkennung einer Zielzelle beitragen können. Hierzu gehören neben pharmakologischen Wirkstoffen auch Nukleinsäure-Aptamere, die Strukturen auf der Zelloberfläche spezifisch binden können (Hicke, B.J. et al. (1996) J. Clin. Invest. 98, 2688). Moleküle, die den Gentransfer in die Zellen erleichtern, können auf unterschiedliche Weise wirken. Sie können einerseits aus Proteinen oder Peptiden bestehen, die an eine DNA oder

eine synthetische Peptid-Nukleinsäure gebunden vorliegen und den Transport der Nukleinsäure in den Zellkern der Zelle erleichtern (Schwartz, B. et al. (1999) Gene Therapy 6, 282; Brandén, L.J. et al. (1999) Nature Biotechnology 17, 784). Weiterhin kann es sich um Moleküle handeln, die die Freisetzung der
5 Nukleinsäure in das Zytoplasma der Zelle verbessern (Planck, C. et al. (1994) J. Biol. Chem. 269, 12918; Kichler, A. et al. (1997) Bioconjug. Chem. 8, 213), oder um Moleküle, die die Stabilität der Nukleinsäure in der Zelle verbessern, wie die DNA-kondensierenden kationischen Polymere Poly-L-Lysin und Polyethylenimin (Lechardeur, D. et al. (1999) Gene Therapy 6, 482).

10

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung der erfundungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung, das die folgenden Schritte umfaßt:

- 15 (i) Bereitstellen eines Gemischs aus mindestens einem entsprechenden kationischen Lipid (KL) und mindestens einem entsprechenden nicht-kationischen Lipid (NKL), und Bereitstellen mindestens einer hierin definierten Nukleinsäure;
20 (ii) Vermischen des Gemischs aus (KL) und (NKL) mit der mindestens einen Nukleinsäure (N);
(iii) ggf. Lyophilisieren; und
(iv) ggf. Rekonstituieren.

Unter dem "Bereitstellen" der genannten Ausgangsstoffe wird hierin sowohl das
25 vorangehende Herstellen eines Ausgangsstoffs als auch das Verwenden eines bereits hergestellten, möglicherweise im Handel erhältlichen, Ausgangsstoffs verstanden. Im letzteren Falle kann es empfehlenswert sein, die jeweiligen Konzentrationsangaben vor Verwendung zu überprüfen und ggf. entsprechend einzustellen.

30

Üblicherweise wird in Schritt (ii) das Gesamtlipid aus (KL) und (NKL) und die Nukleinsäure (N) im Verhältnis von ca. 1:1 bis ca. 10:1, jeweils bezogen auf das Gewicht, vermischt werden. Es ist ersichtlich, daß sämtliche zwischen diesen Werten liegenden Gewichtsverhältnisse von der vorliegenden Offenbarung mitumfaßt sind, z.B. ca. 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, insbesondere auch alle Gewichtsverhältnisse, die jeweils um den Wert 0,1 ansteigen, z.B. 4,1:1, 4,2:1, usw. Besonders bevorzugt sind Gewichtsverhältnisse von ca. 4:1 bis ca. 5:1, da sich bei diesen Verhältnissen eine überraschend hohe Transfektionseffizienz, insbesondere *in vivo*, feststellen läßt.

10

In einer bevorzugten Ausführungsform des vorgeschlagenen Verfahrens erfolgt in Schritt (i) die Bereitstellung des Gemisches aus (KL) und (NKL) und/oder die Bereitstellung der Nukleinsäure (N) unter Verwendung eines stabilisierenden Mittels, insbesondere mindestens eines Zuckers, mindestens eines anorganischen Salzes und/oder mindestens eines mehrwertigen Alkohols. Wie oben ausgeführt, wirkt dieses Mittel insbesondere nachteiligen Wirkungen einer eventuellen Lyophilisierung entgegen. Das stabilisierende Mittel kann in Form einer isoosmotischen (ca. 300-330 mOsm) Lösung verwendet werden. Ein besonders bevorzugtes Beispiel eines stabilisierenden Mittels ist eine Kombination aus Saccharose als Zucker und NaCl als anorganischem Salz. Es ist vorteilhaft, diese Kombination in Form einer isoosmotischen wäßrigen Lösung einzusetzen, beispielsweise mit einer Konzentration von 100 mM Saccharose/100 mM NaCl oder 250 mM Saccharose/25 mM NaCl. Nukleinsäure-Lipid-Komplexe, die unter Verwendung der letztgenannten Lösungen hergestellt wurden, weisen eine besonders gute Stabilität auf und bewirken eine effiziente Transfektion *in vitro* und *in vivo*.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher eine pharmazeutische Zusammensetzung, die nach dem hierin vorgeschlagenen Verfahren erhalten werden kann.

30

Die vorliegende Erfindung umfaßt als Gegenstand weiterhin die Verwendung der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung in der Gentherapie einschließlich einer Kombinationstherapie mit pharmakologischen Wirkstoffen. Dabei kann es zweckmäßig sein, eine Gentherapie mit weiteren therapeutischen

5 Ansätzen zu kombinieren, wie z.B. der Applikation von pharmakologischen Wirkstoffen einschließlich Proteinen und/oder Peptiden. Beispielsweise kann eine Gentherapie mit iNOS kombiniert werden mit einer Applikation von Nitraten, Kalzium-Antagonisten und/oder β -Adrenorezeptor-Antagonisten (in Hinsicht auf letztere Applikation siehe Dieterich, H.A. et al. (Hrsg.) Koronare Herzkrankheit,

10 WVG GmbH, Stuttgart, 1993). Bevorzugt ist die Behandlung von Gefäßerkrankungen, genetisch bedingten Erkrankungen und/oder durch Gentransfer therapierbaren Erkrankungen einschließlich deren Prävention. Besonders bevorzugt ist ihre Verwendung zur Behandlung und Prävention von peripheren und/oder koronaren Gefäßerkrankungen. Beispiele sind u.a.

15 Bluthochdruck, Arteriosklerose, einschließlich der Arteriosklerose von Transplantaten sowie die Stenose oder Restenose von Gefäßen einschließlich Gefäßtransplantaten, insbesondere auch der koronaren Herzkrankheit und des Myokardinfarkts. Die Behandlung/Prävention der Stenose von Gefäßen einschließlich Gefäßtransplantaten, der Restenose nach einer perkutanen

20 transluminalen Angioplastie (PTA) von koronaren und/oder peripheren Gefäßen, einer Mangeldurchblutung von Geweben (hierbei wird die Revaskularisierung der ischämischen Gewebe angestrebt), der koronaren Herzkrankheit, des Myokardinfarkts und/oder der Gefäßarteriosklerose, insbesondere nach Transplantation von Gefäßen und/oder Organen, ist hierbei wiederum besonders

25 bevorzugt. Eine weitere bevorzugte Ausführungsform ist die Verwendung der hierin beschriebenen pharmazeutischen Zusammensetzung für die lokale somatische Gentherapie. Hierbei können therapeutisch wirksame Gene über einen somatischen Gentransfer lokal in die Gefäßwand übertragen und dort exprimiert werden, was im Vergleich zu der lokalen Applikation von Medikamenten eine

30 Verlängerung der therapeutischen Wirkung ermöglicht (siehe z.B. DE 197 29 769). Besonders bevorzugt ist die lokale somatische Gentherapie unter Einsatz

einer minimalinvasiven und effizienten Kathetertechnologie, mit der gezielt einzelne Gefäßabschnitte *in vivo* transfiziert werden können. Für diesen Zweck ist ein Infiltrator®-Katheter (siehe z.B. DE 197 29 769) besonders bevorzugt.

- 5 Üblicherweise wird die pharmazeutische Zusammensetzung mit einer Gesamtdosis in einem Bereich von ca. 0,1 bis ca. 20 µg (einschließlich aller dazwischenliegenden Werte), bezogen auf die Gesamtmenge an Nukleinsäure, verabreicht. In diesem Zusammenhang ist dem Fachmann klar, daß als "dazwischenliegender Wert" jeder Wert zwischen den angegebenen Ober- und
- 10 Untergrenzen verstanden wird, wie 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, usw.; 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, usw., 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, usw.; 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, usw.; 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, usw.; 5,0, usw.; 6,0, usw.; 7,0, usw.; 8,0, usw.; 9,0, usw.; 10,0, usw.; 11,0, usw., 12,0, usw.; 13,0, usw.; 14,0, usw.; 15,0, usw.; 16,0, usw., 17,0, usw.; 18,0, usw.; 19,0, usw.; 20,0. Es liegt auf der Hand, daß die
- 15 tatsächlich eingesetzte Dosis, die genaue Zusammensetzung, die Zeit und die Art der Verabreichung sowie die weiteren Einzelheiten der Behandlung angesichts der vorliegenden Offenbarung variiert werden können. Als ein geeignetes Tiermodell kann entweder das normale Hausschwein (Schwartz, R.S. et al. (1990), Circulation 82, 2190; Karas, S.P. et al. (1992) J. Am. Coll. Cardiol. 20, 467) oder
- 20 das sog. Minischwein (Tumbleson, M.E. und Schook, L.B. (1996) Advances in swine in biomedical research, Plenum Press, New York, Bd. 2, 684; siehe auch Unterberg, C. et al. (1995) J. Am. Coll. Cardiol. 26, 1747) eingesetzt werden. Die in diesen Modellen ermittelten Ergebnisse können dann auf den Menschen entsprechend übertragen werden. Vorzugsweise wird die pharmazeutische
- 25 Zusammensetzung mit einer Gesamtdosis in einem Bereich von ca. 0,5 µg bis ca. 10 µg, besonders bevorzugt ca. 1 µg bis ca. 5 µg, jeweils bezogen auf die Gesamtmenge an Nukleinsäure, verabreicht.

- Bei Verwendung der iNOS als therapeutisch wirksamem Gen lässt sich neben einer gefäßerweiternden und antithrombotischen Wirkung vor allem eine antiproliferative Wirkung auf die glatten Muskelzellen der Gefäßwand erzielen. In

dem vorgenannten Tiermodell wurde überraschenderweise *in vivo* bei einer Gesamtdosis von 2 µg DNA eine bessere Transfektionseffizienz festgestellt als bei einer Gesamtdosis von 10 µg. Bei Verwendung der HO-1 als therapeutisch wirksamem Gen lässt sich eine gefäßerweiternde und antithrombotische Wirkung 5 erzielen. Darüber hinaus wird die HO-1 in Transplantationsmodellen als entzündungshemmend und immunprotektiv beschrieben (Hancock et al. (1998), *supra*; und Soares et al. (1998), *supra*). Demgemäß kann die HO-1 als therapeutisch wirksames Gen in der hierin beschriebenen pharmazeutischen Zusammensetzung auch zur Entzündungshemmung und Immunprotektion von 10 Transplantaten eingesetzt werden. Die Einbringung eines HO-1-exprimierenden Plasmids, beispielsweise in Aorten-Transplantate bei der Ratte, soll die Entwicklung von Arteriosklerose in den transplantierten Gefäßabschnitten verhindern. In einem weiteren Schritt kann durch die Expression der HO-1 die Entwicklung von Arteriosklerose in venösen Transplantaten verhindert werden, 15 wozu sich ebenfalls die Tiermodelle Maus, Ratte, Schwein (s. oben) und Affe eignen. Der Gentransfer kann hier entweder mittels eines Infiltrator®-Katheters in die Gefäßwand erfolgen oder durch Perfusion der Gefäßtransplantate. Einzentrales klinisches Anwendungsgebiet ist somit die Verhinderung der Arteriosklerose in Gefäß- und Organtransplantaten. Daneben ist ein Einsatz zur 20 Behandlung der koronaren Herzkrankheit und des Myokardinfarkts, sowie von koronaren und peripheren Verschlußkrankheiten analog zur NOS möglich. Bei Verwendung von MCP-1 als therapeutisch wirksamem Gen in der hierin beschriebenen pharmazeutischen Zusammensetzung kann sowohl die Arteriogenese (d.h. die Bildung von Kollateralgefäßen aus bereits vorhandenen 25 Arteriolen), als auch die Angiogenese (d.h. die Bildung neuer Kapillaren) induziert werden. Die Einbringung eines MCP-1-exprimierenden Plasmids mittels eines Infiltrator®-Katheters in periphere oder koronare Gefäße ist dazu gedacht, die Revaskularisierung von ischämischen Geweben zu induzieren. Hierzu kann das von Ito et al. (*supra*) beschriebene Kaninchenmodell (insbesondere für 30 periphere Gefäße) eingesetzt werden, sowie die hierin beschriebenen Tiermodelle des Schweins (insbesondere zur Anwendung bei Koronargefäßen). Zur

Applikation ist für beide Spezies der Infiltrator®-Katheter vorgesehen. Therapeutische Anwendungsgebiete sind somit insbesondere die koronare Herzkrankheit, periphere Verschlußkrankheiten und der Myokardinfarkt. In einer besonderen Ausführungsform wird MCP-1 zusammen mit GM-CSF verwendet.

- 5 "Colony-stimulating factors" (CSFs) sind Proteine, die die Proliferation und Differenzierung von hämatopoietischen Vorläuferzellen vermitteln. Die Mitglieder dieser Proteinfamilie sind nach den Zelltypen benannt, deren Proliferation bzw. Differenzierung sie stimulieren: M-CSF (auch CSF-1 genannt, sowie seine alternativen Spleißformen wie CSF-4) wirkt spezifisch auf
10 Makrophagen, G-CSF (CSF-3) auf Granulozyten, während GM-CSF (CSF-2) beide Zelltypen stimuliert. Ein weiteres Mitglied dieser Proteinfamilie ist Multi-CSF, das als Interleukin-3 bekannt ist. Die cDNA-Sequenz des humanen GM-CSF wurde von Wong, G.G. et al. (Science 228, 810, 1985) beschrieben. In der Arteriogenese bewirkt GM-CSF, gegebenenfalls in synergistischer Wirkung mit
15 MCP-1, die Aktivierung und Proliferation von Makrophagen, was die Bildung von Kollateralgefäßen aus Arteriolen zur Folge hat (WO 99/17798).

- Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Verfahren zur therapeutischen und/oder prophylaktischen Behandlung eines Subjekts, wobei das
20 Verfahren das Verabreichen einer wirksamen Menge der vorstehend beschriebenen pharmazeutischen Zusammensetzung umfaßt.

- Schließlich betrifft ein weiterer Aspekt der Erfindung die Verwendung einer isoosmotischen Zusammensetzung umfassend mindestens ein Mono- und/oder
25 Disaccharid, und/oder mindestens einen mehrwertigen Alkohol und/oder mindestens ein anorganisches Salz zur Stabilisierung von Nukleinsäure-Lipid-Komplexen in Lösung und/oder bei Lyophilisierung und/oder Rekonstituierung. Bei Verwendung der Zusammensetzung zur Stabilisierung von Nukleinsäure-Lipid-Komplexen in Lösung sind insbesondere die in der nachfolgenden Tabelle
30 aufgeführten Ausführungsformen 1-5, zur Stabilisierung bei Lyophilisierung und/oder Rekonstituierung insbesondere die Ausführungsformen 1-6 bevorzugt.

Besonders vorteilhaft für diese Zwecke ist die Verwendung einer Zusammensetzung, die Saccharose als Disaccharid und Natriumchlorid als anorganisches Salz enthält. Ein Beispiel für eine derartige isoosmotische Zusammensetzung (z.B. 300 mOsm) ist eine Kombination von Natriumchlorid in einer Konzentration in einem Bereich von ca. 5 mM bis ca. 100 mM, insbesondere 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 oder 50 mM, mit einem entsprechenden Anteil an Saccharose. Des weiteren ist die Verwendung einer Zusammensetzung enthaltend Mannit allein oder in Kombination mit mindestens einem weiteren Mono- und/oder Disaccharid wie z.B. Saccharose oder Trehalose für die vorgenannten Zwecke bevorzugt.

5 Beispielsweise kann eine derartige isoosmotische Zusammensetzung (z.B. 300 mOsm) eine Kombination von Mannit in einer Konzentration in einem Bereich von ca. 10-290 mM, insbesondere ca. 150-290 mM, und Saccharose bzw. Trehalose entsprechend in einer Konzentration in einem Bereich von ca. 10-290 mM, insbesondere ca. 10-150 mM, enthalten.

10

15

Ausführungsform	M-/D-Saccharid	mehrw. Alkohol	anorg. Salz
1	+	+	
2	+		+
3	+	+	+
4		+	
5		+	+
6			+

Die folgenden Figuren und Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern, ohne sie darauf zu beschränken.

20

BESCHREIBUNG DER FIGUREN

- Fig. 1 zeigt die Expression der iNOS *in vitro* in glatten Muskelzellen des Schweins: Vergleich der Expressionssysteme DAC-30, DMRIE-C und FuGENE
5
- Fig. 2 zeigt die Expression der iNOS *in vivo* in der A. femoralis des Schweins: Vergleich der Expressionssysteme DAC-30, FuGENE (Fig. 2A) und DMRIE-C (Fig. 2B)
- Fig. 3 zeigt die Größe der DAC-30/DNA-Komplexe in Abhängigkeit vom
10 Lipid-DNA-Verhältnis
-
- Fig. 4 zeigt die Expression der iNOS in der A. femoralis des Schweins: Einfluß der DNA-Dosis auf die Expressionseffizienz *in vivo*
- Fig. 5 zeigt die Expression der iNOS *in vitro* in COS-7-Zellen: Expressions-
effizienz in den Transfektionslösungen L11-L15
15 Fig. 6 zeigt die Expression der iNOS *in vivo* in der A. femoralis des Schweins: Vergleich der Transfektionseffizienz in Lösung 11 und 15
- Fig. 7 zeigt die Expression der iNOS *in vivo* in der A. femoralis des Schweins: Transfektionseffizienz in Lösung 15 nach Lyophilisierung und Rekonstitution
20 Fig. 8 zeigt die Expression der iNOS *in vivo* in der A. femoralis des Schweins: Abhängigkeit der Transfektionseffizienz von der DNA-Dosis bei lyophilisierten/rekonstituierten Komplexen (Fig. 8A: Transfektion mittels Infiltrator®-Katheter; Fig. 8B: Transfektion mittels Infiltrator®-Katheter und Implantation eines Wiktor®-i-Stents)

BEISPIELE

I. Material und Methoden

5 1. Eingesetzte Transfektionssysteme

1.1 DAC-Chol enthaltende Formulierungen

Als Trägerstoff der liposomalen Formulierung fungiert DAC-30, das über die Firma G.O.T. (Berlin) vertrieben wird. DAC-30™ ist der Handelsname für ein Gemisch aus DAC-Cholesterol und dem neutralen Lipid DOPE im Gewichtsverhältnis 30:70 (DAC-Chol : DOPE), dessen Herstellung wie in WO 96/20208 und DE 196 23 916 beschrieben erfolgt. Auf entsprechende Weise lassen sich weitere Gemische von DAC-Chol zu DOPE herstellen wie DAC-40 (40:60) oder DAC-50 (50:50). Vor Verwendung wurden die Konzentrationsangaben überprüft.

1.2 Weitere Transfektionssysteme

Zu Vergleichszwecken wurden weiterhin DMRIE-C (1,2-Dimyristoyl-oxypropyl-3-dimethylhydroxyethylammoniumbromid) von LifeTechnologies (Rockville, Maryland, USA) und FuGENE™ (Boehringer Mannheim) eingesetzt.

2. Eingesetzte iNOS-Expressionsvektoren

25

2.1 Das Plasmid pSCMV-iNOS enthält die cDNA-Sequenz der murinen iNOS. Seine Herstellung ist in DE 44 11 402 beschrieben.

30

2.2 Das Plasmid pcDNA3-HsiNOS enthält die cDNA-Sequenz der humanen iNOS mit einem modifizierten 3'-Terminus. Die cDNA der humanen iNOS wurde hergestellt durch die Umschreibung von isolierter RNA aus stimulierten humanen Hepatozyten in cDNA. Diese wurde in den

Klonierungsvektor pGEM-T (Promega) insertiert, um zunächst das Plasmid pGEM-HsINOS zu konstruieren. Aus diesem wurde die cDNA mit den Restriktionsendonukleasen NotI und ApaI herausgeschnitten und in den Expressionsvektor pcDNA3 (Invitrogen) eingefügt. Das so hergestellte Plasmid pcDNA3-HsINOS enthält die cDNA für die humane iNOS, wobei die 3'-terminale DNA-Sequenz kodierend für die vier C-terminalen Aminosäuren MSAL durch eine DNA-Sequenz kodierend für eine Insertion von 20 Aminosäuren (NPAAMAAGSMRRRALFYSVT) ausgetauscht wurde.

5 2.3 Plasmid pAH 1 wurde hergestellt durch Ausschneiden eines 0,9 kb großen
10 Fragments enthaltend den 3' Terminus der humanen iNOS-cDNA mit der

Restriktionsendonuklease SfiI aus dem Plasmid pcDNA3-HsINOS. Dieses Fragment wurde ersetzt durch Einsetzen eines 0,9 kb großen PCR-Fragments, das die 3'-terminale, native cDNA-Sequenz der humanen iNOS enthielt, in die SfiI-Schnittstelle.

15 2.4 Plasmid pAH 9 wurde durch Ausschneiden eines NotI-ApaI-Fragments, das die humane iNOS-cDNA-Sequenz enthielt, aus pAH 1 und Einsetzen dieses Fragments in das Plasmid pAH 7 erhalten. Letzteres wurde hergestellt durch Modifizierung von pcDNA3 (Invitrogen) mittels Herausschneiden eines 2 kb umfassenden BbsI-BsmI-Fragments, Auffüllen der 5'-Enden und Religation,

20 wodurch die folgende Deletion eingeführt wurde: Teile der BGH-Polyadenylierungssequenz, der f1-Replikationsursprung, der SV40-Replikationsursprung, das Neomycinresistenzgen und Teile der SV40-Polyadenylierungssequenz. Weiterhin wurde die das Ampicillinresistenzgen enthaltende DNA-Sequenz mit dem Restriktionsenzym BspHI herausgeschnitten und durch ein PCR-Fragment mit dem Kanamycin-resistenzgen aus dem Plasmid pZErO-2 (Invitrogen) ersetzt.

25

3. Zur Stabilisierung der Lipid-Nukleinsäure-Komplexe einsetzbare Lösungen:

Bezeichnung	Inhalt
Lösung 1 (L1)	300 mM Mannit
Lösung 2 (L2)	50 mM Mannit 250 mM Saccharose
Lösung 3 (L3)	100 mM Mannit 200 mM Saccharose
Lösung 4 (L4)	150 mM Mannit 150 mM Saccharose
Lösung 5 (L5)	200 mM Mannit 100 mM Saccharose
Lösung 6 (L6)	250 mM Mannit 50 mM Saccharose
Lösung 11 (L11)	0,9 % NaCl
Lösung 12 (L12)	300 mM Glucose
Lösung 13 (L13)	300 mM Saccharose
Lösung 14 (L14)	100 mM Saccharose 100 mM NaCl
Lösung 15 (L15)	250 mM Saccharose 25 mM NaCl
Lösung 16 (L16)	300 mM Trehalose
Lösung 17 (L17)	50 mM Trehalose 250 mM Saccharose
Lösung 18 (L18)	100 mM Trehalose 200 mM Saccharose
Lösung 19 (L19)	150 mM Trehalose 150 mM Saccharose
Lösung 20 (L20)	200 mM Trehalose 100 mM Saccharose
Lösung 21 (L21)	250 mM Trehalose 50 mM Saccharose
Lösung 22 (L22)	50 mM Trehalose 250 mM Mannit
Lösung 23 (L23)	100 mM Trehalose 200 mM Mannit
Lösung 24 (L24)	150 mM Trehalose 150 mM Mannit
Lösung 25 (L25)	200 mM Trehalose 100 mM Mannit
Lösung 26 (L26)	250 mM Trehalose 50 mM Mannit

4. Eingesetzte Tiermodelle

Für die Studien wurden das sogenannte „Münchner Minischwein“ oder „Göttinger Minischwein“ eingesetzt (siehe Tumbleson, M.E. und Schook, L.B. (1996) *supra*; Unterberg, C. et al. (1995) *supra*). Letztere Versuchstiere können von der Universität Göttingen, Institut für Genetik und Tierzüchtung und der Firma Ellegaard Laboratory Pigs (Dalmose, Dänemark) bezogen werden. Durch Verwendung eines Injektionskatheters kann die Transfektion auf glatte Muskelzellen in der Media-Zellschicht von Blutgefäßen lokal begrenzt werden. Die Bezugsgröße ist die DNA-Dosis pro Injektion. Gegebenfalls kann man auch die Plasmidkopienzahl pro Injektion als Bezugsgröße wählen. Im Fall von Plasmid pAH 9 mit einer Größe von 6915 Bp entsprechen beispielsweise 2 µg etwa $2,6 \times 10^{11}$ Kopien. In den Beispielen 16 und 17 wurde das Göttinger Minischwein eingesetzt; in den anderen Versuchen das Münchner Minischwein.

15

5. Eingesetzte Kathetertechnologie

Es wurden der Infiltrator®-Katheter von IVT (San Diego, CA, USA), Modell DD140015 (siehe DE 197 29 769) und der Wiktor®-i-Stent von Medtronic (Minneapolis, MN, USA), Modell 6320 verwendet.

20

6. Herstellung und Transfektion von Lipoplexen aus DAC-30 und Plasmid-DNA enthaltend die humane iNOS cDNA

25 6.1 Herstellung des Transfektionsmediums

Im Falle von Lösung 15 wurde eine Lösung von 250mM Saccharose und 25mM NaCl in sterilem, pyrogenfreiem Wasser hergestellt. Diese Lösung wurde in der Sterilbank durch Filtration durch einen sterilen Filter mit 0,2 µm Porenweite sterilisiert.

30

6.2 Vorbereitung der DAC-30-Lösung

Die Gefäße mit DAC-30 wurden bis zu ihrer Rekonstituierung ungeöffnet bei -20°C gelagert. Die Rekonstituierung erfolgte durch Zugabe von sterilem, pyrogenfreiem Wasser (Endkonzentration 2 mg/ml). Die Gefäße wurden verschlossen, 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend 2 min mit einem Vortex-Schüttler gemischt. Vor jeder Verwendung wurde die DAC-30-Lösung erneut 30 sec mit einem Vortex-Schüttler gemischt.

6.3 Herstellung der Lipid-Nukleinsäure-Komplexe aus DAC-30 und DNA

Alle hierfür notwendigen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die jeweilige DNA-Menge wurde in die Hälfte des benötigten Endvolumens an Transfektionslösung pipettiert. Zur anderen Hälfte des benötigten Endvolumens an Transfektionslösung wurde die vierfache Menge an DAC-30 (bezogen auf das Gewicht) zugegeben. Die Lösungen wurden mit einem Vortex-Schüttler homogenisiert. Anschließend wurde die DAC-30-Lösung langsam tropfenweise zur DNA-Lösung zugegeben. Die entstehende Lösung wurde durch mehrmaliges Aufziehen in die Pipettenspitze oder durch Drehen des geschlossenen Reaktionsgefäßes gemischt.

Als ein typisches Beispiel soll die folgende Herstellung eines DAC-30/DNA-Gemischs mit einem Lipid-DNA-Verhältnis von 4:1 (w/w) zur Verabreichung einer therapeutischen Dosis von 2 µg dienen: 7,5 µl DNA (bei einer Konzentration von 1 µg/µl entsprechend 7,5 µg) wurden durch Zugabe von Transfektionslösung auf ein Endvolumen von 750 µl gebracht und durch Mischen mit dem Vortex-Schüttler homogenisiert. Die vierfache Menge DAC-30, d.h. 30 µg (bei einer Konzentration von 2 µg/µl entsprechend 15 µl), wurde ebenfalls in 750 µl Transfektionslösung aufgenommen und durch Mischen mit dem Vortex-Schüttler homogenisiert. Dann wurden 750 µl DAC-Lösung langsam tropfenweise in die 750 µl der DNA-Lösung pipettiert. Die entstehende Lösung enthielt in 1,5 ml Gesamtvolumen Lipid-DNA-Komplexe mit einer DNA-Konzentration von 5 µg/ml. Diese Lösung war

über einen Zeitraum von mindestens 48 h bei 4°C stabil und konnte entweder sofort verwendet, oder wie nachfolgend beschrieben lyophilisiert und in 1,5 ml Wasser rekonstituiert werden. Es konnten dann 400 µl dieser Lösung wie nachfolgend beschrieben in die A. femoralis des Schweins injiziert werden, was einer therapeutischen Dosis von 2 µg DNA entspricht.

5 6.4 Schema und Durchführung der Lyophilisierung

Die Gefäße enthaltend die DAC-30/DNA-Lipoplexe wurden unter sterilen Bedingungen eingefroren und es wurde eine Gefriertrocknung nach folgendem, beispielhaften Schema durchgeführt. Dem Fachmann ist ersichtlich, daß eine Gefriertrocknung auch unter abweichenden Bedingungen

10

durchgeführt werden kann:

- 40 Stunden bei -37°C Stellflächentemperatur und 0,140 mbar Druck.
- Temperaturerhöhung der Stellfläche um 10°C/h bis 20°C erreicht sind.
- Nachtrocknung für 2h bei 0,01 mbar.

15 6.5 Entnahme und Aufbewahrung der Proben

Die Entnahme der Proben erfolgte unter sterilen Bedingungen. Die Lyophilisate wurden bis zur Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

6.6 Vorbereiten der Proben für kathetervermittelte Transfektion *in vivo*

20 Die Lyophilisate (enthaltend eine definierte Menge an DAC-30/DNA-Komplexen) wurden unmittelbar vor der Operation in 1,5ml sterilem, pyrogenfreien Wasser rekonstituiert. Die Rücklösung wurde optisch kontrolliert.

6.7 Transfektion der Gefäßwand mittels Infiltrator-Katheter *in vivo* (Modell Minischwein)

25 Ein Minischwein wurde intubiert, narkotisiert und für den chirurgischen Eingriff vorbereitet, woran sich eine Darstellung und Punktierung der linken Arteria carotis anschloß. Dann erfolgte die Positionierung des Führungsdrähtes für eine Schleuse, an die sich die Installation der Schleuse, sowie eine Gabe von 5.000 iU Heparin anschloß. Anschließend wurde eine Übersichts-Angiographie mit Standbild zur Darstellung der Morphologie der rechten und linken Arteria femoralis vorgenommen. Anhand dieses

30

Standbildes wurden die prospektiven Transfektionsstellen bestimmt. Als nächstes erfolgte die Positionierung des Führungsdrahts in der linken Arteria femoralis und die Angiographie-Darstellung der korrekten Position des Führungsdrähtes sowie das Aufziehen und Positionieren des IVT-Injektionskatheters mit anschließender Inflation des Ballon des IVT-Injektionskatheters mit 3,0 bar. Dann wurde eine Angiographie zur Kontrolle der vollständigen Gefäßokklusion vorgenommen. Es folgte eine manuelle Injektion von 300 µl bzw. 400 µl der rekonstituierten DAC-30/DNA-Komplexe unter ständiger Kontrolle des Ballondrucks. Anschließend wurde der Katheter entfernt und optional ein Stent-Implantat mit 12 bar für 20s unter angiographischer Kontrolle exakt an der Injektionsstelle positioniert. Bei Implantation eines Stents erfolgte anschließend die Gabe von 1000-2000 iU Heparin. Nach einer Abschlußangiographie wurden alle Operationswunden verschlossen.

15 6.8 Auswertung

Die Auswertung hinsichtlich der Transfektionseffizienz erfolgte durch immunhistochemische Färbung von Dünnschnitten der Blutgefäße, die 3 Tage nach Operation entnommen wurden (siehe DE 197 29 769 mit der Abweichung, daß Gefäße, in die ein Stent implantiert wurde, in Kunststoff eingebettet wurden. Die Schichtdicke der Dünnschnitte betrug bei Kunststoffpräparaten 4 µm und bei Gefrierschnitten 10 µm). Alternativ erfolgte die Auswertung hinsichtlich der Wirksamkeit durch Ultraschall-Untersuchung der Versuchstiere über einen Zeitraum von 3-4 Wochen und anschließende histochemische Bearbeitung von Dünnschnitten der entnommenen Gefäße.

7. Biochemischer Nachweis der iNOS

Die Bildung von Stickoxid durch die iNOS wurde durch den Nachweis von Nitrit im Zellkultur-Überstand wie folgt nachgewiesen: In eine Flachbodenplatte mit 96 Vertiefungen wurden 100 µl des zu untersuchenden Zellkulturüberstands pipettiert. Zu den Proben wurden jeweils 50 µl einer

2 %-igen Sulfanilamidlösung in 2,5 % H₃PO₄ und 50 µl einer 0,2 %-igen Naphtylethylendiaminlösung in 2,5 % H₃PO₄ zugegeben. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption der Proben bei 540 nm mit einer Standardreihe (NaNO₂ in einer Konzentration von 0 µM, 1 µM, 5
2,5 µM, 5,0 µM, 10 µM, 20 µM bzw. 40 µM in Zellkulturmedium) verglichen.

II. Beispiele

10

1. Vergleich liposomaler Transfektionsmittel zur Expression von Stickoxid-synthase *in vitro*: DAC-30, DMRIE-C und FuGENE™

Versuch: Es wurden Transfektionslösungen hergestellt bestehend aus kationischen Liposomen und dem Plasmid pSCMV-iNOS (murine iNOS-cDNA). Die
15 Transfektionslösungen wurden hergestellt durch Mischen einer konstanten Dosis von 8 µg DNA mit den kationischen Liposomen DAC-30 (1:5, w/w), DMRIE-C (1:2, w/v) bzw. FuGENE™ (1:1, w/v) in BSS-Puffer (137 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 10 mM Tris/Cl pH 7,6). Glatte Muskelzellen aus der Aorta des Schweins wurden in Zellkulturschalen mit je 6 Vertiefungen kultiviert. Es wurden jeweils
20 500 µl Transfektionslösung (enthaltend DNA in einer Konzentration von 16 µg/ml) je Vertiefung zu den Zellen gegeben, für 1 h bei 37°C inkubiert und nach Austausch der Lösungen gegen Zellkulturmedium wurden die Zellen für 48 h weiterkultiviert. Anschließend wurde aus dem Zellkulturiüberstand der
transfizierten Zellen die Menge an akkumuliertem Nitrit im Vergleich zu einer
25 Kontrolltransfektion ohne DNA bestimmt (s. I.7).

Ergebnis: Die Expression der induzierbaren Stickoxidsynthase (iNOS) *in vitro* war abhängig vom verwendeten Lipid. Eine Transfektionslösung enthaltend DAC-30/iNOS-DNA führte *in vitro* zu einer geringeren Expression der
30 induzierbaren Stickoxidsynthase als Transfektionslösungen enthaltend FuGENE/iNOS-DNA oder DMRIE-C/iNOS-DNA (siehe Fig. 1).

2. Vergleich liposomaler Transfektionsmittel zur Expression von Stickoxid-synthase *in vivo*: DAC-30, DMRIE-C und FuGENE™

Versuch: Es wurden Transfektionslösungen hergestellt bestehend aus kationischen Liposomen und dem Plasmid pSCMV-iNOS (murine iNOS-cDNA). Zur Herstellung der Transfektionslösung wurde eine Dosis von 10 µg Plasmid-DNA mit DAC-30 im Verhältnis 1:5 (w/w), mit DMRIE-C im Verhältnis 1:2 (w/v), bzw. mit FuGENE™ im Verhältnis 1:1 (w/v) in BSS-Puffer (137 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 10 mM Tris/Cl pH 7,6) gemischt. Jeweils zwei Stellen der rechten 10 und linken Arteria femoralis des Schweins wurden *in vivo* mittels eines Infiltrator®-Katheters (IVT) mit den wie beschrieben hergestellten Lösungen transfiziert. Nach einer Versuchsdauer von 3 Tagen erfolgte die Entnahme der transfizierten Gefäßabschnitte. Die Auswertung der immunhistochemischen Anfärbung von Dünnschnitten der entnommenen Gefäße mit einem monoklonalen 15 Antikörper gegen induzierbare Stickoxidsynthase erfolgte qualitativ im Vergleich zu einem unbehandelten Kontrollgefäß.

Ergebnis: Transfektionslösungen enthaltend DAC-30/iNOS-DNA zeigten *in vivo* eine deutlich bessere Transfektionseffizienz als Liposomen-DNA-Komplexe 20 enthaltend FuGENE™/iNOS-DNA oder DMRIE-C/iNOS-DNA. Dies war angesichts der in Beispiel 1 erhaltenen *in vitro*-Daten ein sehr überraschendes Ergebnis (siehe Fig. 2.A und 2.B).

3. DAC-30: Expression und Toxizität *in vitro* in Abhängigkeit vom Lipid-DNA-Verhältnis 25

Versuch: Glatte Muskelzellen aus der Aorta des Schweins (s. Beispiel 1) wurden in Zellkulturschalen mit je 6 Vertiefungen kultiviert und mit Liposomen-DNA-Komplexen bestehend aus DAC-30 und dem Plasmid pAH 1 (humane iNOS-cDNA) transfiziert. Zur Herstellung der Transfektionslösung (0,9 % NaCl, 2 mM 30

- CaCl₂) wurde DAC-30 mit einer konstanten Dosis von 4 µg DNA (entsprechend einer Konzentration von 8 µg/ml) im Verhältnis 2:1, 4:1, 5:1, 6:1 und 8:1 gemischt. Alternativ dazu wurde bei einem konstanten Liposomen-DNA-Verhältnis von 5:1 eine DNA-Dosis von 2 µg/ml, 4 µg/ml, 8 µg/ml bzw. 16 µg/ml 5 zur Herstellung der Transfektionslösung eingesetzt. Es wurden jeweils 500 µl Transfektionslösung je Vertiefung zu den Zellen zugegeben, für 1 h bei 37°C inkubiert und nach Austausch der Lösungen gegen Zellkulturmedium für 48 h weiterkultiviert. Nach 48h wurde aus dem Zellkulturüberstand der transfizierten Zellen die Menge an akkumuliertem Nitrit im Vergleich zu einer 10 Kontrolltransfektion ohne DNA in Transfektionslösung (0,9 % NaCl, 2 mM CaCl₂) bzw. zu untransfizierten Zellen (Medium) bestimmt (s. I.7). Parallel wurde die Zytotoxizität der Transfektionslösung durch einen Vitalitätstest (Aufnahme von Neutralrotlösung) getestet.
- 15 Ergebnis: Die Expression der induzierbaren Stickoxidsynthase durch liposomale Komplexe enthaltend DAC-30/iNOS-DNA war abhängig vom Lipid-DNA-Verhältnis bei der Herstellung der Komplexe. Die Expression des Transgens war bei einer konstanten Dosis von 4 µg iNOS-Plasmid (Konzentration 8 µg/ml) optimal für ein Lipid-DNA-Verhältnis von 5:1. Gleichzeitig wiesen diese 20 liposomalen Komplexe eine geringe Zytotoxizität bei Transfektion *in vitro* auf. Beim einem geeigneten Liposomen-DNA-Verhältnis von 5:1 zeigten Liposomen-DNA-Komplexe enthaltend DAC-30/iNOS-DNA eine optimale Expressionseffizienz bei einer DNA-Konzentration von 4 µg/ml bis 8 µg/ml und eine geringe Zytotoxizität bis zu einer DNA-Konzentration von 8 µg/ml. (Daten 25 nicht gezeigt).

4. Komplexgröße in Abhängigkeit vom Lipid-DNA-Verhältnis

- 30 Versuch: Es wurde eine Transfektionslösung hergestellt bestehend aus Komplexen von DAC-30 und dem Plasmid pAH 9 (humane iNOS-cDNA) in Kochsalzlösung (0,9 % NaCl/2 mM CaCl₂). Zur Herstellung der Liposomen-

DNA-Komplexe wurde DAC-30 im Gewichtsverhältnis 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1 und 8:1 zur Plasmid-DNA eingesetzt bei einer konstanten DNA-Konzentration von 6,7 µg/ml DNA. Die Größenbestimmung der Komplexe erfolgte durch Photonенkorrelations-Spektroskopie (Zetasizer).

5

Ergebnis: Lipid-DNA-Gemische enthaltend DAC-30/iNOS-DNA bildeten bei einer konstanten DNA-Konzentration von 6,7 µg/ml in Abhängigkeit vom Lipid-DNA-Verhältnis (2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 8:1) Komplexe zunehmender Partikelgröße aus (siehe Fig. 3).

10

5. Komplexgröße in Abhängigkeit von DNA-Menge beeinflußt die Expressionseffizienz *in vivo*

- 15 Versuch: Es wurden Lipid-DNA-Gemische hergestellt bestehend aus Komplexen von DAC-30 und dem Plasmid pcDNA3-HsINOS (humane iNOS-cDNA mit modifiziertem 3'-Terminus) in einer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl, 2 mM CaCl₂). Zur Herstellung der Liposomen-DNA-Komplexe wurde DAC-30 im Verhältnis 5:1 zur Plasmid-DNA eingesetzt bei einer DNA-Dosis von 2 µg (Konzentration 6,7 µg/ml) bzw. 10 µg DNA (Konzentration 33,3 µg/ml). Unmittelbar nach 20 Herstellung wurde die Größe der gebildeten Komplexe durch Photonenkorrelations-Spektroskopie (Zetasizer) bestimmt. Mit entsprechend hergestellten Transfektionslösungen wurden jeweils zwei Stellen der rechten und linken Arteria femoralis des Schweins *in vivo* mittels Infiltrator™-Katheter transfiziert. Nach einer Versuchsdauer von 3 Tagen erfolgte die Entnahme der 25 transfizierten Gefäßabschnitte. Die Auswertung der immunhistochemischen Anfärbung von Dünnschnitten der entnommenen Gefäße mit einem monoklonalen Antikörper gegen induzierbare Stickoxidsynthase erfolgte qualitativ im Vergleich zu einem unbehandelten Kontrollgefäß.
- 30 Ergebnis: Die frisch hergestellten Lipid-DNA-Gemische enthaltend DAC-30/iNOS-DNA im Verhältnis 5:1 bildeten bei einer Dosis von 2 µg iNOS-Plasmid

(entsprechend einer Konzentration von 6,7 µg/ml) Komplexe einer geringeren Partikelgröße (ca. 580 nm) aus, als bei einer Dosis von 10 µg iNOS-Plasmid (entsprechend einer Konzentration von 33,3 µg/ml (ca. 1000 nm). Bei Transfektion in die Gefäßwand der Arteria femoralis des Schweins *in vivo* zeigten 5 diese Gemische bei einer Dosis von 2 µg iNOS-Plasmid eine bessere Transfektionseffizienz als bei einer Dosis von 10 µg iNOS-Plasmid. Die bessere Transfektionseffizienz einer geringeren Dosis *in vivo* (siehe Fig. 4) war überraschend und korreliert mit einer geringeren Partikelgröße der DNA-Liposomen-Komplexe bei dieser Dosis.

10

6. Wirksamkeit: Verhinderung der Neointimabildung nach Transfektion von iNOS-DNA/DAC-30

Versuch: Es wurden Transfektionslösungen hergestellt bestehend aus DAC-30 15 und 0,7 µg (entsprechend einer DNA-Konzentration von 2,3 µg/ml) des Plasmids pAH1 (humane iNOS-cDNA) bzw. des Kontrollplasmids pcDNA3 (ohne cDNA-Insertion) im Verhältnis 5:1 in einer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl/2 mM CaCl₂). Jeweils zwei Stellen der rechten und linken Arteria femoralis des Schweins 20 wurden *in vivo* mittels Infiltrator®-Katheter (IVT) mit den wie beschrieben hergestellten Lösungen transfiziert. Anschließend wurde zur Induktion der Neointima-Bildung ein Wiktor®-i-Stent (Medtronic) an jeder Transfektionsstelle plaziert. Nach einer Versuchsdauer von 6 Wochen erfolgte die Entnahme der 25 transfizierten Gefäßabschnitte. Die Auswertung von Dünnschnitten der entnommenen Gefäße erfolgte quantitativ durch Morphometrie im Vergleich zur Kontrolle (Plasmid pcDNA3) (n = 3).

Ergebnis: Die Expression der iNOS nach Transfektion von Lösungen enthaltend DAC-30/iNOS-DNA in die Arteria femoralis des Schweins *in vivo* bewirkte eine 30 Reduktion der Neointima-Bildung (bestimmt als Verhältnis von Neointima zu Media) um ca. 20 % (Daten nicht gezeigt).

7. Zeitabhängige Stabilität von Lipid-DNA-Komplexen

Versuch: Es wurden Lipid-DNA-Gemische hergestellt bestehend aus DAC-30 und dem Plasmid pAH 9 (humane iNOS-cDNA) im Verhältnis 4:1 und 5:1 bei einer ansteigenden DNA-Konzentration von 2,3 µg/ml, 6,7 µg/ml und 13,3 µg/ml in Lösung 11 (0,9 % NaCl). Die Größe der entstehenden Liposomen-DNA-Komplexe wurde sofort nach Herstellung bzw. nach einer Standzeit von 3 h bei 4 °C durch Photonenzirkulations-Spektroskopie (Zetasizer) bestimmt.

10 Ergebnis: Lipid-DNA-Gemische enthaltend DAC-30/iNOS-DNA bildeten bei einem Lipid-DNA-Verhältnis von 4:1 Komplexe in einem definierten Größenbereich von ca. 540 bis 700 nm aus, die auch bei steigender DNA-Konzentration von 2,3 µg/ml, 6,7 µg/ml und 13,3 µg/ml über einen Zeitraum von 3 h bei 4 °C konstant blieb. Diese konstante Partikelgröße ist ein Maß für die 15 Stabilität der Komplexe. Hingegen nahm bei einem Lipid-DNA-Verhältnis von 5:1 die Größe der Komplexe bei ansteigender DNA-Menge von 2,3 µg/ml, 6,7 µg/ml und 13,3 µg/ml über einen Zeitraum von 3 h bei Raumtemperatur wie folgt zu: Bei 2,3 µg/ml im Mittel um den Faktor 2 von ca. 650 nm auf ca. 1280 nm, bei 6,7 µg/ml um den Faktor 3 von ca. 740 nm auf ca. 2200 nm und bei 20 13,3 µg/ml um den Faktor 2,5 von ca. 940 nm auf ca. 2300 nm. Diese zeitabhängige Größenzunahme bedeutet, daß die Komplexe instabil waren. (Daten nicht gezeigt).

8. Zeitabhängige Stabilität von Lipid-DNA-Komplexen in verschiedenen Transfektionslösungen

25 Versuch: Es wurde ein Lipid-DNA-Gemisch hergestellt bestehend aus DAC-30 und dem Plasmid pAH 9 (humane iNOS-cDNA) im Verhältnis 4:1 bei einer konstanten DNA-Konzentration von 5 µg/ml. Die Herstellung dieser Liposomen-DNA-Komplexe erfolgte in verschiedenen Lösungen: L 12 (300 mM Glucose), L 13 (300 mM Saccharose), L 14 (100 mM Saccharose, 100 mM NaCl), L 15

(250 mM Saccharose, 25 mM NaCl) oder L 11 (0,9 % NaCl). Die Größe der Liposomen-DNA-Komplexe wurde entweder sofort nach Herstellung oder nach Lagerung bei 4 °C für 3 h, 24 h bzw. 48 h durch Photonenkorrelations-Spektroskopie (Zetasizer) bestimmt.

5

Ergebnis: Lipid-DNA-Gemische enthaltend DAC-30/iNOS-DNA bildeten bei einem Lipid-DNA-Verhältnis von 4:1 und einer DNA-Konzentration von 5 µg/ml Komplexe in einem definierten Größenbereich von ca. 460 bis 610 nm aus. Diese Komplexgröße blieb in den Transfektionslösungen L 13, L 14 und L 15 über einen Zeitraum von 3 h bis 48 h bei 4°C weitgehend konstant (Zunahme ca. um 10 Faktor 1,2 in Lösung 13, ca. um Faktor 1,4 in Lösung 14 bzw. ca. um 1,1 in Lösung 15), d.h. die gebildeten Komplexe waren stabil. DAC-30/DNA-Komplexe hingegen, die in L 11 hergestellt worden waren, zeigten über einen Zeitraum von 3 h bis 48 h eine deutliche Zunahme der Partikelgröße ca. um den Faktor 2,5, d.h. 15 die gebildeten Komplexe waren instabil. Eine leichte Zunahme der Partikelgröße, ca. um den Faktor 1,6, wurde auch in Lösung 12 festgestellt. (Daten nicht gezeigt)

9. Expressionseffizienz *in vitro* in verschiedenen Transfektionslösungen

20 Versuch: Es wurde eine Transfektionslösung hergestellt bestehend aus DAC-30 und dem Plasmid pAH 9 (humane iNOS- cDNA) in den Lösungen L 12 (300 mM Glucose), L 13 (300 mM Saccharose), L 14 (100 mM Saccharose, 100 mM NaCl), L 15 (250 mM Saccharose, 25 mM NaCl) oder L 11 (0,9% NaCl). Zur Herstellung der Transfektionslösung wurde DAC-30 im Verhältnis 4:1 einer 25 konstanten DNA-Menge von 2 µg (entsprechend einer Konzentration von 5 µg/ml) zugesetzt. Die Liposomen-DNA-Komplexe wurden sofort nach Herstellung in COS-7-Zellen transfiziert. Nach 48 h wurde das gebildete Nitrit im Zellkultur-Überstand nachgewiesen (s. I.7). Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten, die Expressionshöhe wurde über die Meßwerte 30 eines Neutralrot-Tests normalisiert (siehe Fig. 5).

Ergebnis: Die Expression der induzierbaren Stickoxidsynthase durch Lipid-DNA-Gemische enthaltend DAC-30/iNOS-DNA war weitgehend unabhängig von der Zusammensetzung der Transfektionslösung. Die Lösungen L 12, L 13, L 14 und L 15 zeigten eine mit L 11 vergleichbare Expressionseffizienz bei einem konstanten Lipid-DNA-Verhältnis von 4:1 und einer Dosis von 2 µg DNA (siehe Fig. 5).

10. Transfektionseffizienz *in vivo* in Lösung 15 im Vergleich zu Lösung 11

10 Versuch: Es wurden Transfektionslösungen hergestellt bestehend aus DAC-30 und 2 µg des Plasmids pAH1 (humane iNOS-cDNA) im Verhältnis 5:1 in Lösung 15 (250 mM Saccharose, 25 mM NaCl) bzw. Lösung 11 (0,9 % NaCl). Jeweils zwei Stellen der rechten und linken Arteria femoralis des Schweins wurden *in vivo* mittels Infiltrator™-Katheter (IVT) mit den wie beschrieben hergestellten Lösungen transfiziert. Nach einer Versuchsdauer von 3 Tagen erfolgte die Entnahme der transfizierten Gefäßabschnitte. Quantitative Auswertung der immunhistochemischen Daten: Auftragung der Mittelwerte von 5 mittig in der Transfektionsstelle gelegenen Schnitten (Abstand jeweils 500 µm)(n = 2 Schweine).

20

Ergebnis: Liposomen-DNA-Komplexe enthaltend DAC-30/iNOS-DNA in L 15 zeigten *in vivo* bei einer Dosis von 2 µg iNOS-Plasmid eine bessere Transfektionseffizienz als in L 11 hergestellte Komplexe. Die bessere Wirksamkeit der Transfektionslösung L 15 *in vivo* war nach den vorliegenden *in vitro* generierten Daten (siehe Beispiel 10) nicht zu erwarten (siehe Fig. 6).

11. Kurzzeit-Stabilität von DAC-30/DNA-Komplexen in Lösung 15

30 Versuch: Es wurde ein Lipid-DNA-Gemisch hergestellt bestehend aus DAC-30 und dem Plasmid pAH 9 (humane iNOS-cDNA) im Verhältnis 4:1 in Lösung 15 (250 mM Saccharose, 25 mM NaCl). Die DNA-Konzentration betrug 2,5 µg/ml,

10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, bzw. 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Die Partikelgröße der Lipid-DNA-Gemische wurde sofort nach Herstellung bzw. Rekonstituierung der lyophilisierten Komplexe (0 h), sowie nach einer Standzeit von 3 h bei 4 °C durch Photonenkorrelations-Spektroskopie (Zetasizer) bestimmt.

5

Ergebnis: Lipid-DNA-Gemische enthaltend DAC-30/iNOS-DNA zeigten bei einem Lipid-DNA-Verhältnis von 4:1 und einer ansteigenden DNA-Konzentration von 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in Lösung 15 über einen Zeitraum von 3 h eine konstante Partikelgröße (Größenzunahme kleiner als 15 %). Diese konstante Partikelgröße über einen Zeitraum von mindestens 3 h bleibt vorteilhafterweise auch nach Lyophilisierung der Komplexe und anschließender Rekonstituierung in sterilem Wasser stabil erhalten. Die Lyophilisierung hat somit keinen Einfluß auf die Kurzzeit-Stabilität der Liposomen-DNA-Komplexe. (Daten nicht gezeigt).

10

12. Langzeit-Stabilität von DAC-30/DNA-Komplexen in Lösung 15

Versuch: Es wurde ein Lipid-DNA-Gemisch hergestellt bestehend aus DAC-30 und dem Plasmid pAH 9 (humane iNOS-cDNA) im Verhältnis 4:1 in Lösung 15 (250 mM Saccharose, 25 mM NaCl). Die DNA-Konzentration betrug 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, bzw. 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Durch Photonenkorrelations-Spektroskopie (Zetasizer) wurde die Partikelgröße der hergestellten Komplexe sofort (0 h), bzw. nach einer Standzeit von 3 h, 24 h und 48 h bestimmt. Die so hergestellten Transfektionslösungen enthielten eine Gesamtdosis von 1 μg , 2 μg , bzw. 4 μg Plasmid-DNA und wurden sofort (0 h), bzw. nach einer Standzeit von 3 h, 24 h und 48 h in COS-7 Zellen transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde das akkumulierte Nitrit im Zellkultur-Überstand nachgewiesen (s. I.7). Parallel dazu wurde die Menge an zellulärem Protein bestimmt (n=3).

30 Ergebnis: Lipid/DNA-Gemische enthaltend DAC-30/iNOS-DNA zeigten bei einem konstanten Lipid-DNA-Verhältnis von 4:1 und einer zunehmenden DNA-

Konzentration von 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, und 10 µg/ml in Lösung 15 über einen Zeitraum von 48 h eine konstante mittlere Partikelgröße von ca. 480 nm, ca. 500 nm und ca. 510 nm. Die Transfektion von COS-7-Zellen mit diesen Lipid-DNA-Gemischen bewirkte eine gleichbleibende Expression des Transgens nach 5 einer Standzeit der Transfektionslösung von bis zu 48 h. In Lösung 15 hergestellte DAC-30/DNA-Komplexe zeigten vorteilhafterweise über eine Standzeit der Transfektionslösung von bis zu 48 h eine konstante Partikelgröße und Expressionseffizienz, die auch bei zunehmender DNA-Konzentration erhalten blieb. (Daten nicht gezeigt).

10

13. Transfektionseffizienz *in vivo*: Einfluß der DNA-Dosis

Versuch: Es wurden Transfektionslösungen hergestellt bestehend aus DAC-30 und 0,5 µg, 1 µg, bzw. 2 µg des Plasmids pAH 9 (humane iNOS-cDNA) bzw. des 15 Kontrollplasmids pAH 7 (ohne cDNA-Insertion) im Verhältnis 4:1 in Lösung 15 (250 mM Saccharose, 25 mM NaCl). Jeweils zwei Stellen der rechten und linken Arteria femoralis des Schweins wurden *in vivo* mittels Infiltrator™-Katheter (IVT) mit den wie beschrieben hergestellten Lösungen transfiziert. Anschließend wurde ein Wiktor®-i-Stent (Medtronic) an jeder Transfektionsstelle plaziert. Nach einer 20 Versuchsdauer von 3 Tagen erfolgte die Entnahme der transfizierten Gefäßabschnitte. Die Auswertung der immunhistochemischen Anfärbung von Dünnschnitten der entnommenen Gefäße mit einem monoklonalen Antikörper gegen induzierbare Stickoxidsynthase erfolgte quantitativ durch Morphometrie im Vergleich zur Kontrolle (Plasmid pAH 7 bzw. unbehandeltes Gefäß).

25

Ergebnis: Liposomen-DNA-Komplexe enthaltend DAC-30/iNOS-DNA in Lösung 15 zeigten *in vivo* bei einer Dosis von 2 µg iNOS-Plasmid eine bessere Transfektionseffizienz als 0,5 µg bzw. 1 µg (ca. 43 % gegenüber ca. 31,3 % bzw. 13 %, bezogen auf den Anteil der transfizierten Media an gesamter Media). 30 (Daten nicht gezeigt).

14. Transfektionseffizienz *in vivo* in Lösung 15 nach Lyophilisierung und Rekonstituierung

Versuch: Es wurde eine Transfektionslösung hergestellt bestehend aus DAC-30 und dem Plasmid pAH 9 (humane iNOS-cDNA) im Verhältnis 4:1 in Lösung 15. Zur Transfektion von jeweils einer Stelle der rechten bzw. linken Arteria femoralis des Schweins *in vivo* mittels Infiltrator®-Katheter wurde frisch hergestellte (Dosis 2 µg DNA) bzw. lyophilisierte und in steriles Wasser rekonstituierte Transfektionslösung (0,5; 1; und 2 µg DNA) eingesetzt.

10 Anschließend wurde ein Wiktor®-i-Stent (Medtronic) an jeder Transfektionsstelle plaziert. Nach einer Versuchsdauer von 3 Tagen erfolgte die Entnahme der transfizierten Gefäßabschnitte. Die Auswertung der immunhistochemischen Anfärbung von Dünnschnitten der entnommenen Gefäße mit einem monoklonalen Antikörper gegen induzierbare Stickoxidsynthase erfolgte quantitativ durch

15 Morphometrie.

Ergebnis: Eine Transfektionslösung enthaltend DAC-30/iNOS-DNA in Lösung 15 (Dosis von 2 µg DNA) zeigte als rekonstituiertes Lyophilisat überraschenderweise eine um den Faktor 1,5 bessere Transfektionseffizienz *in vivo* als frisch hergestellte Komplexe (Fig. 7; von links nach rechts: Frisch hergestellte Transfektionslösung (2 µg); Kontrolle (2 µg); rekonstituierte Transfektionslösung (0,5; 1; und 2 µg DNA)).

15. Transfektionseffizienz *in vivo* mit lyophilisierten/rekonstituierten Komplexen: DNA-Dosisabhängigkeit

25 Versuch: Es wurden Transfektionslösungen hergestellt bestehend aus DAC-30 und 0,7 µg, 1 µg, 1,5 µg, 2 µg bzw. 4 µg des Plasmids pAH9 (humane iNOS-cDNA) bzw. des Kontrollplasmids pAH 7 (ohne cDNA-Insertion) im Verhältnis 4:1. Die DNA-Liposomen-Komplexe wurden in Lösung 15 hergestellt, 30 lyophilisiert und unmittelbar vor der Transfektion in steriles Wasser rekonstituiert. Jeweils zwei Stellen der rechten und linken Arteria femoralis des

Schweins wurden *in vivo* mittels Infiltrator™-Katheter mit den wie beschrieben hergestellten Lösungen transfiziert (Fig. 8A). Das Experiment wurde alternativ mit Implantation eines Wiktor®-i-Stents durchgeführt (Fig. 8B). Nach einer Versuchsdauer von 3 Tagen erfolgte die Entnahme der Gefäße. Quantitative

- 5 Auswertung der immunhistochemischen Daten der Experimente mit und ohne Stentimplantation: Prozentualer Anteil der transfizierten Media aus den Mittelwerten von 10 µm-Schnitten in Abständen von jeweils 1 mm über den gesamten transfizierten Gefäßabschnitt.

- 10 Ergebnis: Liposomen-DNA-Komplexe enthaltend iNOS-DNA/DAC-30 zeigten als rekonstituiertes Lyophilisat in einer Dosis von 2 µg Plasmid-DNA *in vivo* eine bessere Transfektionseffizienz als in einer Dosis von 0,7 µg, 1 µg, 1,5 µg oder 4 µg (Fig. 8A). Die bessere Transfektionseffizienz bei einer Dosis von 2 µg *in vivo* wurde durch die Implantation eines Stents nicht beeinflußt (siehe Fig. 8B; 15 Implantation eines Wiktor®-i-Stents).

16. Wirksamkeit *in-vivo*: Verhinderung der Neointimabildung durch Transfektion von 1 µg iNOS

- 20 Versuch: Es wurde eine Transfektionslösung hergestellt bestehend aus DAC-30 und 1 µg des Plasmids pAH9 (humane iNOS-cDNA) bzw. des Kontrollplasmids pAH 7 (ohne cDNA-Insertion) im Verhältnis 4:1 in Lösung 15. Die Lösung wurde lyophilisiert und unmittelbar vor Transfektion in jeweils eine Stelle der rechten und linken Arteria femoralis des Schweins *in vivo* mittels Infiltrator®-Katheter in 25 sterilem Wasser rekonstituiert. Anschließend wurde zur Induktion der Neointima-Bildung ein Wiktor®-i-Stent (Medtronic) an jeder Transfektionsstelle plaziert. Nach einer Versuchsdauer von 28 Tagen erfolgte die Entnahme der transfizierten Gefäßabschnitte. Die Auswertung wurde durch intravaskuläre Ultraschall-Untersuchung der transfizierten Gefäßabschnitte vorgenommen und bewertete die 30 Reduktion der gebildeten Neointima nach Behandlung mit dem iNOS-Plasmid im

Vergleich zum Kontrollplasmid als Verhältnis der Plaquefläche zur gesamten Gefäßfläche (n=8).

Ergebnis: In Lösung 15 hergestellte Liposomen/DNA-Komplexe enthaltend eine 5 Dosis von 1 µg iNOS-DNA/DAC-30 bewirkten nach Lyophilisierung und Rekonstituierung in sterilem Wasser eine Reduzierung der Neointima-Bildung im Restenose-Modell Schwein *in vivo* um ca. 42%. (Daten nicht gezeigt).

17. Wirksamkeit *in vivo*: Verhinderung der Neointimabildung durch Transfektion
10 von 0,25 µg, 0,5 µg bzw. 1 µg iNOS

Es wird eine Transfektionslösung hergestellt bestehend aus DAC-30 und 0,25 µg, 15 0,5 µg, bzw. 1 µg des Plasmids pAH 9 (humane iNOS-cDNA) bzw. des Kontrollplasmids pAH 7 (ohne cDNA-Insertion) im Verhältnis 4:1 in Lösung 15. Die Lösung wird lyophilisiert und unmittelbar vor Transfektion in jeweils einer Stelle der rechten und linken Arteria femoralis des Schweins *in vivo* mittels Infiltrator®-Katheter in steriles Wasser rekonstituiert. Anschließend wird zur Induktion der Neointima-Bildung ein Wiktor®-i-Stent (Medtronic) an jeder Transfektionsstelle plaziert. Nach einer Versuchsdauer von 28 Tagen erfolgt die 20 Entnahme der transfizierten Gefäßabschnitte. Die Auswertung wird durch intravaskuläre Ultraschall-Untersuchung der transfizierten Gefäßabschnitte vorgenommen und bewertet die Reduktion der gebildeten Neointima nach Behandlung mit iNOS-Plasmid im Vergleich zum Kontrollplasmid als Verhältnis der Plaquefläche zur gesamten Gefäßfläche.

25
18. Verhinderung der Transplantat-Arteriosklerose *in vivo* durch Gentherapie mit HO-1

Für das Experiment zur Verhinderung der Transplantat-Arteriosklerose werden 30 3-3,5 kg schwere Kaninchen verwendet. Für den chirurgischen Eingriff, der unter sterilen Bedingungen durchgeführt wird, werden die Tiere narkotisiert. Der

Gentransfer in das Spendergefäß wird mittels eines Infiltrator®-Katheters durchgeführt, der über die freigelegte rechte Arteria carotis durch eine Schleuse mittels eines Führungsdrähts in die Arteria iliaca eingeführt wird. Die Injektion des HO-1-Expressionsplasmids in die Gefäßwand der Arteria iliaca mittels 5 Infiltrator®-Katheter erfolgt bei niedrigem Ballondruck (ca. 0,6 atm.). Dabei werden innerhalb von ca. 30 Sekunden 100-150 µl Transfektionslösung, bestehend aus DAC-30 und einem HO-1-Expressionsplasmid im Verhältnis 4:1 in Lösung 15 in die Gefäßwand injiziert. Der Sitz des aufgeblasenen Katheters wird angiographisch kontrolliert. Im Anschluß an die Entfernung des Katheters wird 10 das transfizierte Gefäßsegment entnommen und an entsprechender Stelle in die A. iliaca eines allogenen Empfängerkaninchens eingesetzt. Nach 2-4 Monaten wird mittels Histochemie untersucht, ob sich im Vergleich zu kontrollbehandelten Tieren die Entstehung von arteriosklerotischen Veränderungen in den 15 implantierten Gefäßen (intimale Hyperplasie, Leukozyteninfiltration) reduzieren läßt.

19. Induktion des Wachstums von Kollateralgefäßen *in vivo*-durch Gentherapie mit MCP-1

20 Für das Experiment zur Induktion des Wachstums von Kollateralgefäßen werden 3-3,5 kg schwere Kaninchen (New Zealand White rabbits) verwendet. Für den chirurgischen Eingriff, der unter sterilen Bedingungen durchgeführt wird, werden die Tiere narkotisiert. Die freigelegte Arteria femoralis wird durch zwei Ligaturen im Abstand von 1,5-2 cm so abgebunden, daß die Äste der Arteria profunda 25 femoris, die Arteria circumflexa femoris lateralis und die Arteria circumflexa abdominis durchgängig bleiben. Für den Gentransfer wird ein Infiltrator®-Katheter verwendet, der über die freigelegte rechte Arteria carotis durch eine Schleuse mittels eines Führungsdrähts in die Femoralarterie eingeführt wird. Die Injektion des MCP-1-Plasmids in den proximal der Ligatur gelegenen 30 Gefäßabschnitt erfolgt mittels Infiltrator®-Katheter bei niedrigem Ballondruck (ca. 0,6 atm.). Dabei werden innerhalb von ca. 30 Sekunden 100-150 µl

Transfektionslösung, bestehend aus DAC-30 und einem MCP-1-Expressionsplasmid im Verhältnis 4:1 in Lösung 15 in die Gefäßwand injiziert. Der Sitz des aufgeblasenen Katheters wird angiographisch kontrolliert. Im Anschluß an die Entfernung des Katheters werden alle Operationswunden verschlossen. Nach 7 Tagen wird mittels Angiographie untersucht, ob sich im Vergleich zu kontrollbehandelten Tieren vermehrt Kollateralen gebildet haben. Mit histologischen Methoden wird die Proliferation von Endothelzellen und glatten Muskelzellen im Gefäßsystem der behandelten Gewebe im Vergleich zu kontrollbehandelten Tieren untersucht.

10

20. Induktion des Wachstums von Kollateralgefäß in vivo durch Gentherapie mit MCP-1/GM-CSF

Für das Experiment zur Induktion des Wachstums von Kollateralgefäß werden 15 3-3,5 kg schwere Kaninchen (New Zealand White rabbits) verwendet. Für den chirurgischen Eingriff, der unter sterilen Bedingungen durchgeführt wird, werden die Tiere narkotisiert. Die freigelegte Arteria femoralis wird durch zwei Ligaturen im Abstand von 1,5-2 cm so abgebunden, daß die Äste der Arteria profunda femoris, die Arteria circumflexa femoris lateralis und die Arteria circumflexa abdominis durchgängig bleiben. Ca. 7-21 Tage nach dem Gefäßverschluß wird ein 20 Gentransfer durchgeführt mit Plasmid-DNA, die zur Expression von MCP-1 bzw. GM-CSF in der Gefäßwand führt. Für den Gentransfer wird ein Infiltrator®-Katheter verwendet, der über die freigelegte rechte Arteria carotis durch eine Schleuse mittels eines Führungsdrähts in die Femoralarterie eingeführt wird. Die 25 Injektion von Plasmid-DNA in den proximal der Ligatur gelegenen Gefäßabschnitt mittels Infiltrator®-Katheter erfolgt bei niedrigem Ballondruck (ca. 0,6 atm.). Dabei werden innerhalb von ca. 30 Sekunden 100-150 µl Transfektionslösung, bestehend aus DAC-30 und Plasmid-DNA im Verhältnis 4:1 in Lösung 15 in die Gefäßwand injiziert. Der Sitz des aufgeblasenen Katheters 30 wird angiographisch kontrolliert. Im Anschluß an die Entfernung des Katheters werden alle Operationswunden verschlossen. Nach weiteren 7 Tagen wird mittels

Angiographie untersucht, ob sich im Vergleich zu kontrollbehandelten Tieren vermehrt Kollateralen gebildet haben. Mit histologischen Methoden wird die Proliferation von Endothelzellen und glatten Muskelzellen im Gefäßsystem der behandelten Gewebe im Vergleich zu kontrollbehandelten Tieren untersucht.

5

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft eine pharmazeutische Zusammensetzung in Form eines Nukleinsäure-Lipid-Komplexes enthaltend mindestens ein kationisches Lipid,
10 mindestens ein nicht-kationisches Lipid, mindestens eine Nukleinsäure kodierend
~~für ein Protein zur Behandlung von Gefäßkrankheiten, insbesondere ein Protein~~
mit gefäßerweiternden und/oder gefäßbildenden Eigenschaften, und gegebenenfalls geeignete Hilfs- und/oder Zusatzstoffe, wobei das kationische Lipid (KL) eine von Cholesterin abgeleitete Gruppe enthält, an der über eine
15 Verbindungsgruppe, ausgewählt aus Carboxamiden und Carbamoylen, und einen Spacer, bestehend aus einer linearen oder verzweigten Alkylgruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen, mindestens eine kationische Aminogruppe, ausgewählt aus primärer, sekundärer, tertiärer Aminogruppe und/oder einem quartären Ammoniumsalz, gebunden ist, und wobei die Größe der Nukleinsäure-Lipid-
20 Komplexe in einem Bereich von ca. 300-800 nm liegt. Weiterhin betrifft die Erfindung die Herstellung der pharmazeutischen Zusammensetzung und ihre Verwendung in der Gentherapie.

Cardiogene Gentherapeutische Systeme AG

15. September 1999
C29448 BÖ/HW/

5

Patentansprüche

1. Pharmazeutische Zusammensetzung in Form eines Nukleinsäure-Lipid-Komplexes, enthaltend

-
- (a) mindestens ein kationisches Lipid (KL);
 - (b) mindestens ein nicht-kationisches Lipid (NKL);
 - (c) mindestens eine Nukleinsäure (N) kodierend für ein Protein zur Behandlung von Gefäßkrankheiten, insbesondere ein Protein mit gefäßerweiternden und/oder gefäßbildenden Eigenschaften; und
 - (d) gegebenenfalls weitere Hilfs- und/oder Zusatzstoffe;

wobei das kationische Lipid (KL) eine von Cholesterin abgeleitete Gruppe enthält, an der über eine Verbindungsgruppe, ausgewählt aus Carboxamiden und Carbamoylen, und einen Spacer bestehend aus einer linearen oder verzweigten Alkylgruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen mindestens eine kationische Aminogruppe, ausgewählt aus primärer, sekundärer, tertiärer Aminogruppe und/oder einem quartären Ammoniumsalz, gebunden ist, und wobei die Größe der Nukleinsäure-Lipid-Komplexe in einem Bereich von ca. 300-800 nm liegt.

2. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei die Größe der Nukleinsäure-Lipid-Komplexe in einem Bereich von ca. 350-550 nm liegt.

3. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Nukleinsäure (N) für eine der Isoformen der Stickoxidsynthase (NOS), der Hämoxigenase (HO), des Monocyte Chemoattractant Protein (MCP), oder eine Variante eines dieser Proteine kodiert.

5

4. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 – 3, wobei die Nukleinsäure für die induzierbare Stickoxidsynthase (iNOS), die Hämoxigenase-1 (HO-1), das Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1), oder eine Variante davon, vorzugsweise für die jeweilige humane Form, kodiert.

10

5. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 - 4, wobei das kationische Lipid (KL) 3β -[N-(N,N'-Dimethylaminoethan)-carbamoyl]cholesterin (DAC-Chol) oder 3β -[N-(N',N'-Dimethylaminoethan)-carbamoyl]cholesterin (DC-Chol) ist.

15

6. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 - 5, wobei das nicht-kationisches Lipid (NKL) ein Lipid ausgewählt aus mindestens einem Phosphatidylcholin, mindestens einem Phosphatidylethanolamin und/oder Cholesterin ist.

20

7. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 6, wobei das Phosphatidylethanolamin ein Diacylphosphatidylethanolamin mit einer Kettenlänge von 10-28 Kohlenstoffatomen ist, vorzugsweise Dimyristoylphosphatidylethanolamin (DMPE), Dipalmitoylphosphatidylethanolamin (DPPE) und/oder Dioleylphosphatidylethanolamin (DOPE).

25

8. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 7, wobei das kationische Lipid (KL) DAC-Chol ist und das nicht-kationische Lipid (NKL) DOPE ist, vorzugsweise in einem Gewichtsverhältnis von DAC-Chol zu DOPE von ca. 10:90 bis ca. 90:10, besonders bevorzugt von ca. 30:70.

30

9. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 - 8, wo-
bei die Zusammensetzung unter Einsatz von Gesamtlipid aus (KL) und
(NKL) zu Nukleinsäure (N) im Verhältnis von ca. 1:1 bis ca. 10:1, vor-
zugsweise ca. 4:1 oder ca. 5:1, jeweils bezogen auf das Gewicht, erhalten
worden ist.
10. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 - 9, wo-
bei die Zusammensetzung als Lösung oder als Lyophilisat vorliegt.
-
11. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 - 10,
wobei der genannte Hilfsstoff ein stabilisierendes Mittel ist, insbesondere
mindestens ein Zucker, mindestens ein mehrwertiger Alkohol und/oder
mindestens ein anorganisches Salz.
12. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 - 11,
wobei der genannte Zusatzstoff mindestens ein spezifisch die Zielzellen
erkennendes Molekül und/oder mindestens ein den Gentransfer in die
Zellen erleichterndes Molekül ist.
13. Verfahren zur Herstellung der pharmazeutischen Zusammensetzung nach
einem der Ansprüche 1 - 12, gekennzeichnet durch folgende Schritte:
(i) Bereitstellen eines Gemisches aus einem kationischen Lipid (KL)
gemäß einem der Ansprüche 1 – 12 und einem nicht-kationischen
Lipid (NKL) gemäß einem der Ansprüche 1 – 12, und Bereitstellen
einer Nukleinsäure (N) gemäß einem der Ansprüche 1 – 12;
(ii) Vermischen des Gemisches aus (KL) und (NKL) mit der Nuklein-
säure (N);
(iii) gegebenenfalls Lyophilisieren; und
(iv) gegebenenfalls Rekonstituieren.

14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei in Schritt (ii) das Gesamtlipid aus (KL) und (NKL) und die Nukleinsäure (N) im Verhältnis von ca. 1:1 bis ca. 10:1, vorzugsweise ca. 4:1 oder ca. 5:1, jeweils bezogen auf das Gewicht, vermischt werden.

5

15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, wobei in Schritt (i) die Bereitstellung des Gemisches aus (KL) und (NKL) und/oder die Bereitstellung der Nukleinsäure (N) unter Verwendung eines stabilisierenden Mittels, insbesondere mindestens eines Zuckers, mindestens eines mehrwertigen Alkohols und/oder mindestens eines anorganischen Salzes, erfolgt.

10

16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei das stabilisierende Mittel in Form einer isoosmotischen wäßrigen Lösung verwendet wird.

15 17. Pharmazeutische Zusammensetzung erhältlich nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 13 – 16.

18. Verwendung der pharmazeutischen Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 – 12 oder 17 zur Verwendung in der Gentherapie einschließlich einer Kombinationstherapie mit pharmakologischen Wirkstoffen.

20

19. Verwendung nach Anspruch 18 zur Behandlung von Gefäßerkrankungen, genetisch bedingten Erkrankungen und/oder durch Gentransfer therapierbaren Erkrankungen einschließlich deren Prävention.

25

20. Verwendung nach Anspruch 18 oder 19 zur Behandlung und Prävention von peripheren und/oder koronaren Gefäßerkrankungen.

30

21. Verwendung nach Anspruch 20, wobei die Gefäßerkrankung die Stenose von Gefäßen einschließlich Gefäß-Transplantaten, die Restenose nach einer perkutanen transluminalen Angioplastie (PTA) von koronaren

und/oder peripheren Gefäßen, eine Erkrankung infolge einer Mangel durchblutung von Geweben, die koronare Herzkrankheit, der Myokardinfarkt, die Gefäßarteriosklerose und/oder eine Erkrankung, die zur Abstörung von Gefäß- und/oder Organtransplantaten führt, ist.

5

22. Verwendung nach einem der Ansprüche 18 – 21 für die lokale somatische Gentherapie.

10

23. Verwendung nach Anspruch 22, wobei die Gentherapie unter Verwendung eines Katheters, insbesondere eines Infiltrator-Katheters, erfolgt.

15

24. Verwendung nach Anspruch 22 oder 23, wobei die pharmazeutische Zusammensetzung mit einer Gesamtdosis in einem Bereich von ca. 0,1 - 20 µg, vorzugsweise ca. 0,5 - 10 µg, besonders bevorzugt ca. 1 - 5 µg, jeweils bezogen auf die Gesamtmenge an Nukleinsäure pro Applikation, verabreicht wird.

20

25. Verwendung einer isoosmotischen Zusammensetzung umfassend mindestens ein Mono- und/oder Disaccharid und/oder mindestens einen mehrwertigen Alkohol und/oder mindestens ein anorganisches Salz zur Stabilisierung von Nukleinsäure-Lipid-Komplexen in Lösung.

25

26. Verwendung einer isoosmotischen Zusammensetzung umfassend mindestens ein Mono- und/oder Disaccharid und/oder mindestens einen mehrwertigen Alkohol und/oder mindestens ein anorganisches Salz zur Stabilisierung von Nukleinsäure-Lipid-Komplexen bei Lyophilisierung und/oder Rekonstituierung.

30

27. Verwendung nach Anspruch 25 oder 26, wobei das Disaccharid Saccharose und das anorganische Salz Natriumchlorid ist.

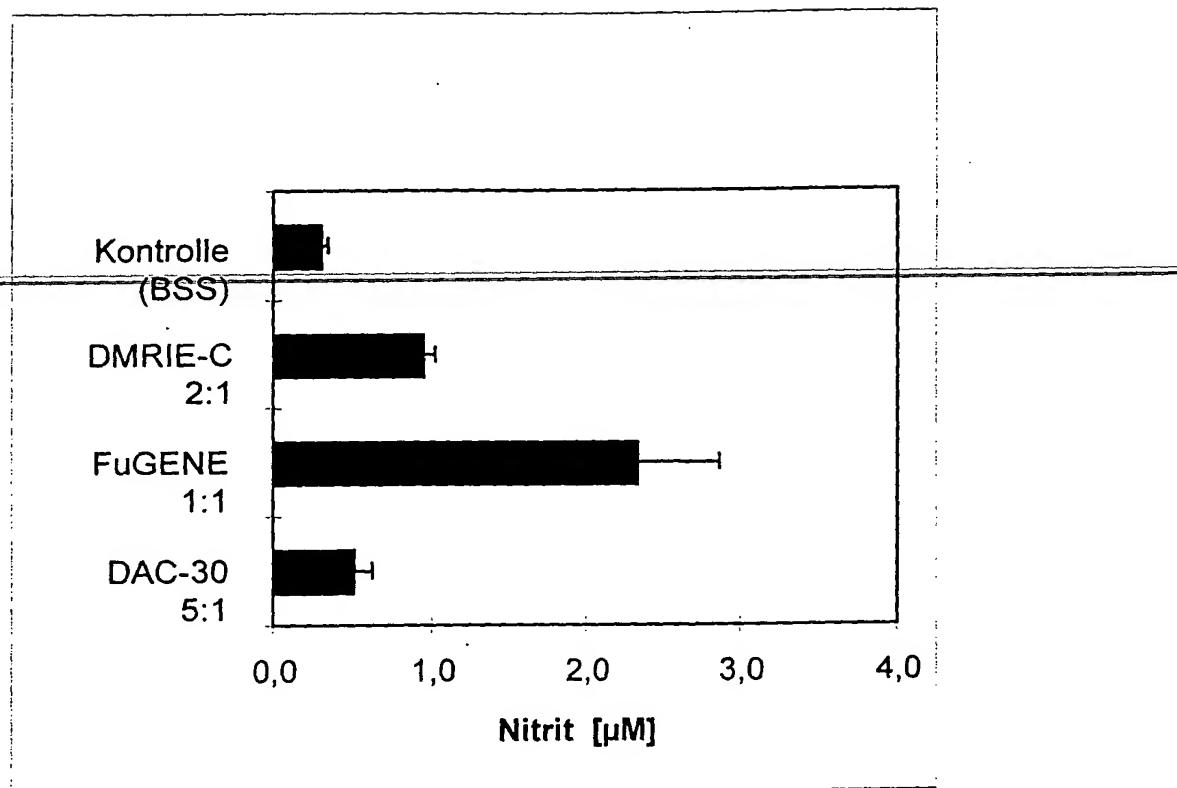


Fig.1

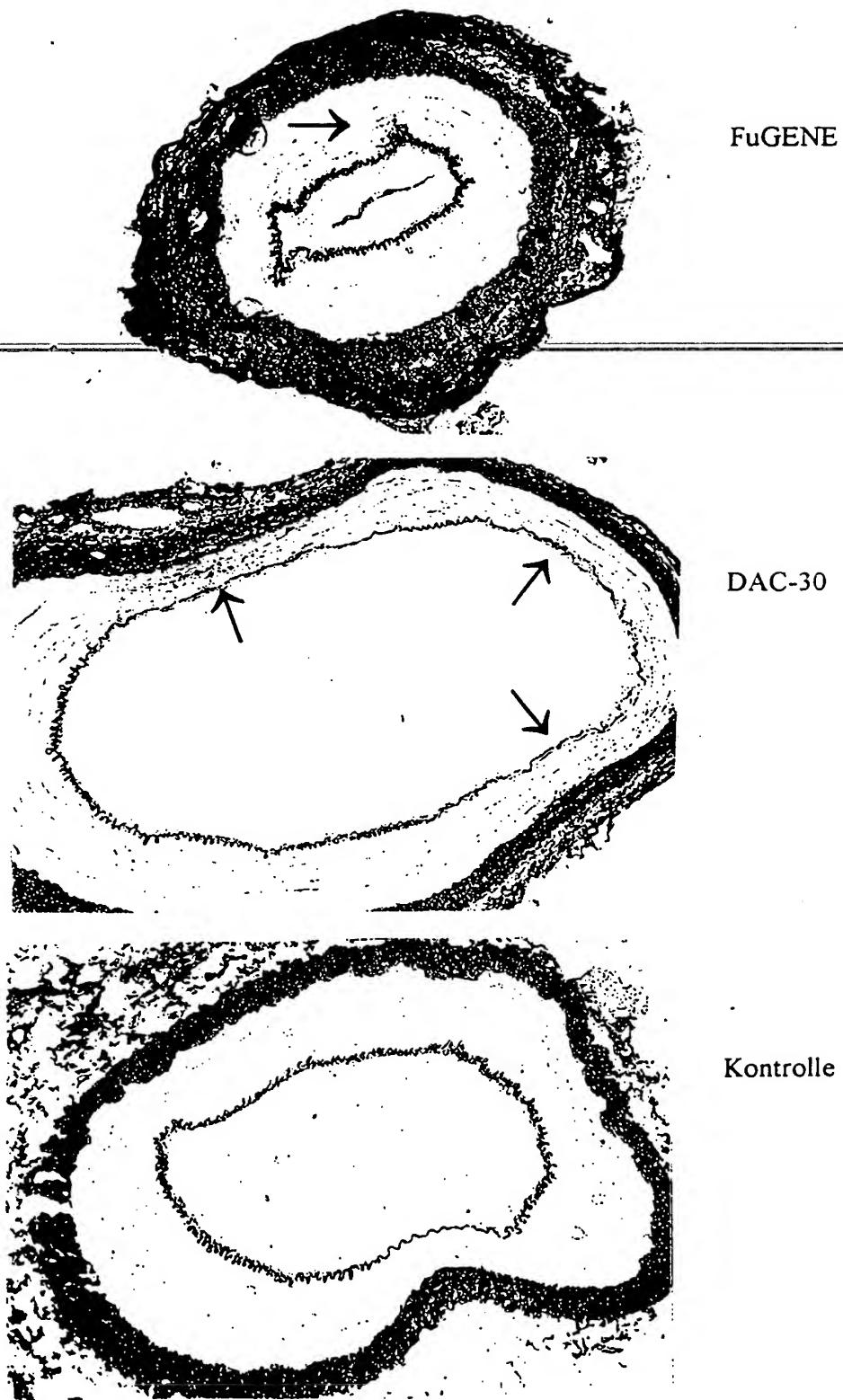
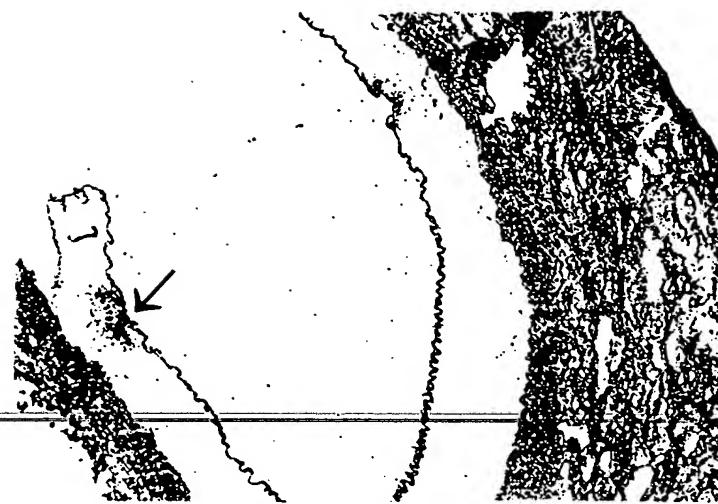
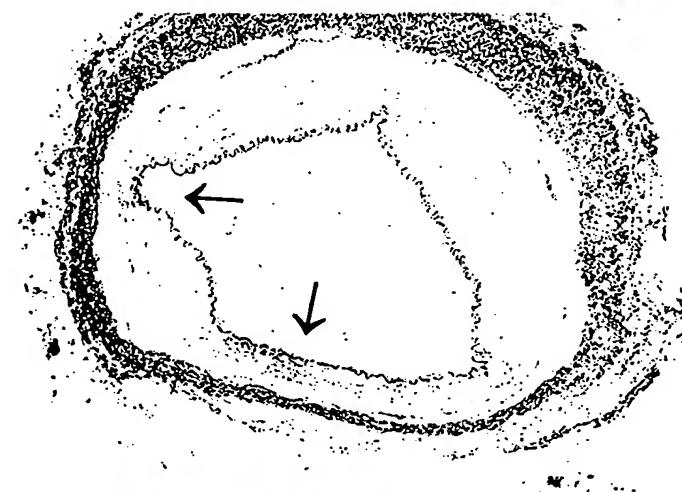


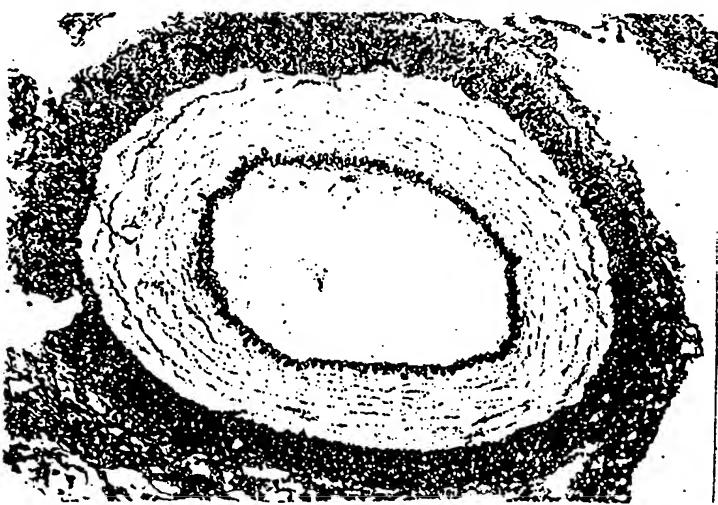
Fig. 2A



DMRIE-C



DAC-30



Kontrolle

Fig. 2B

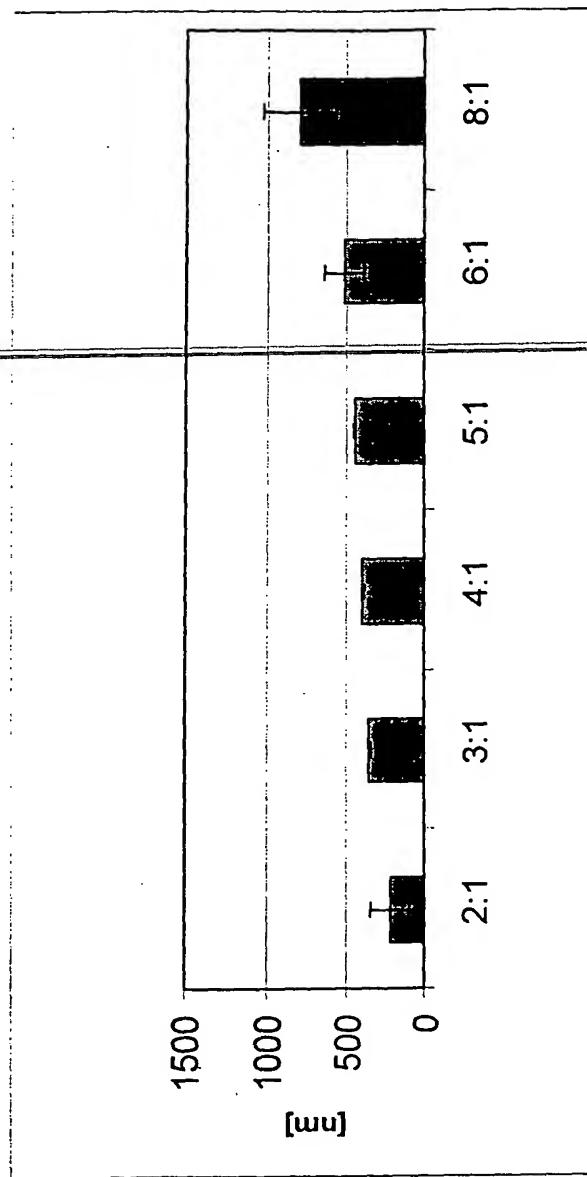


Fig. 3

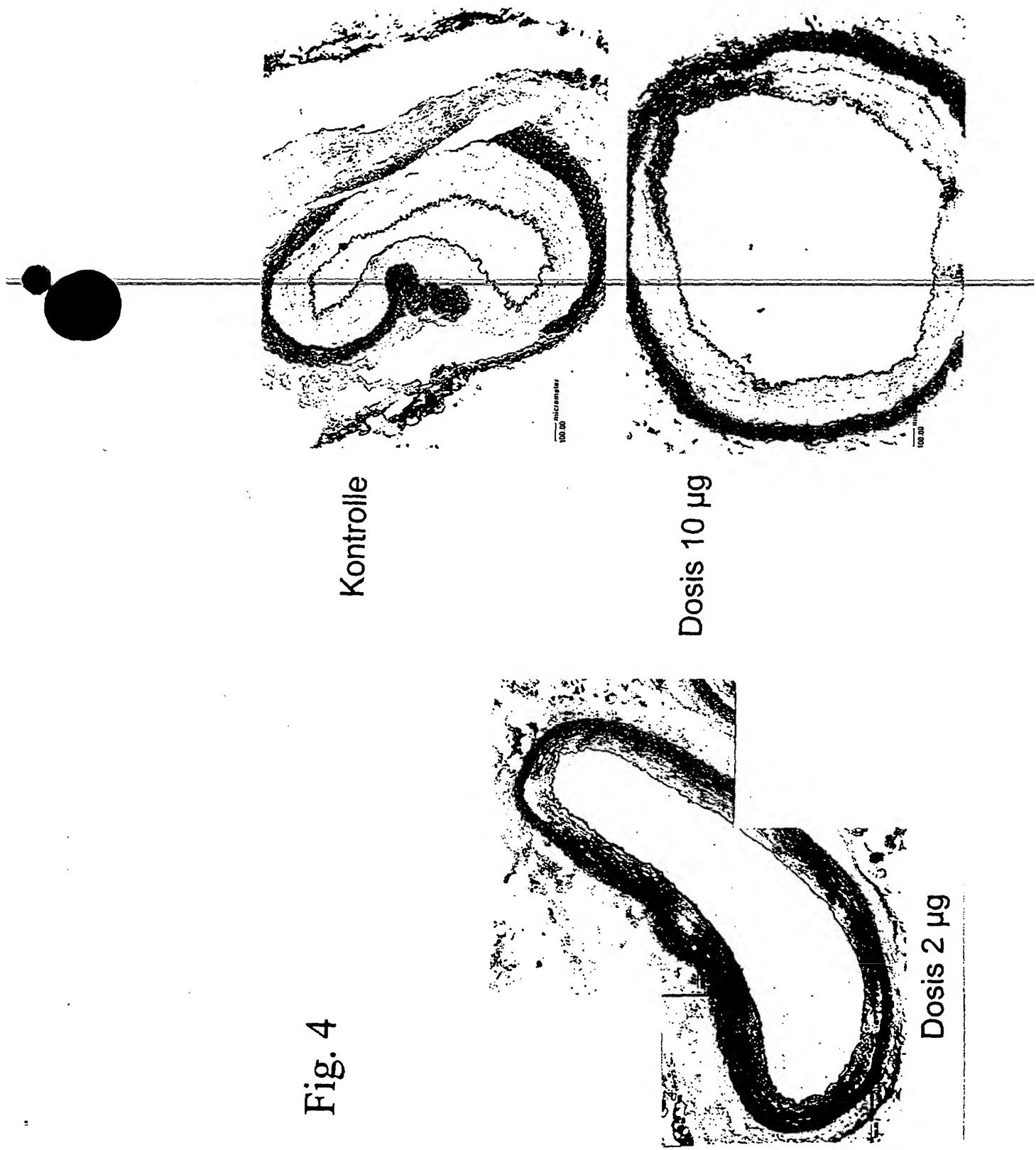


Fig. 4

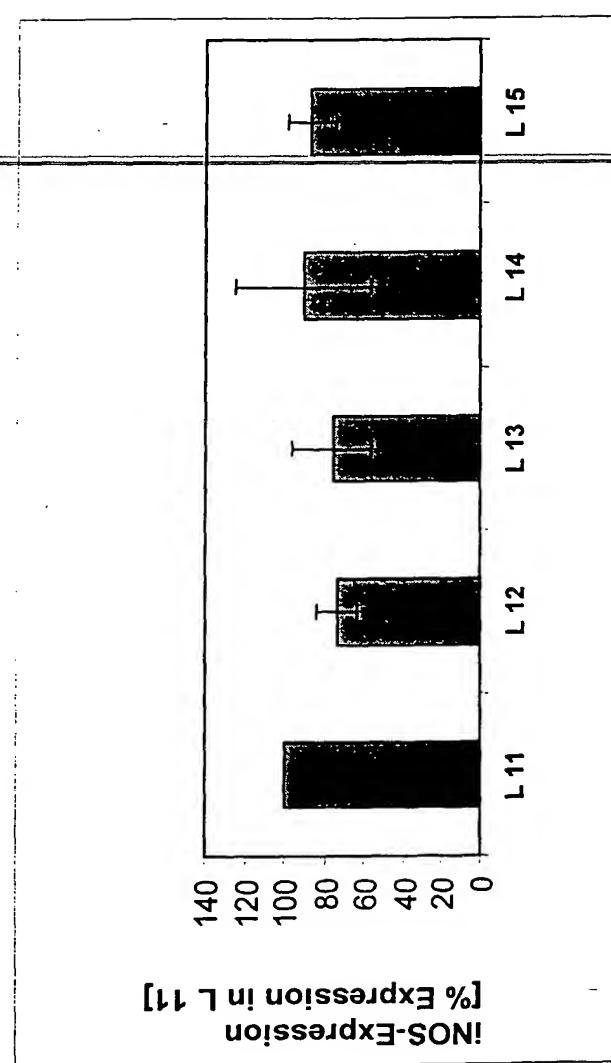


Fig. 5

7/9

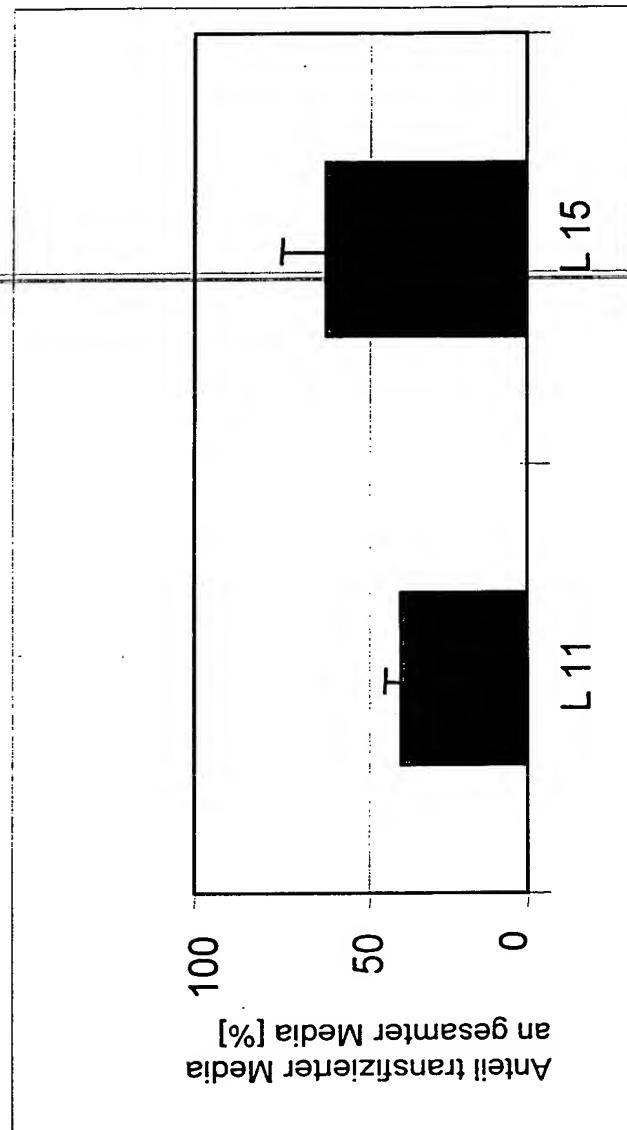


Fig. 6

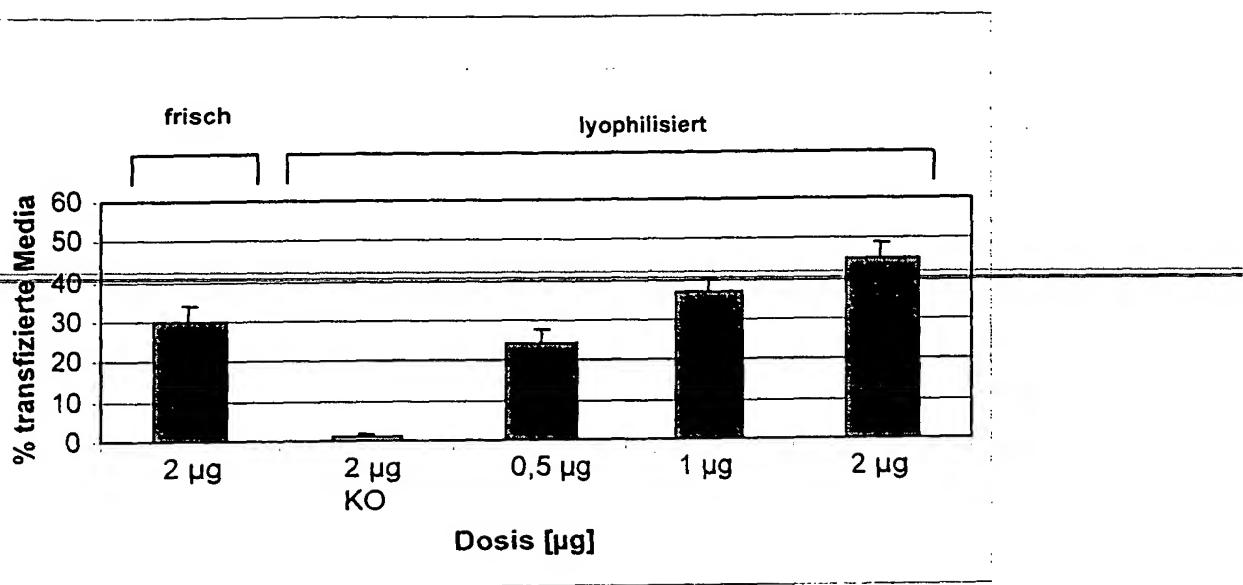


Fig. 7

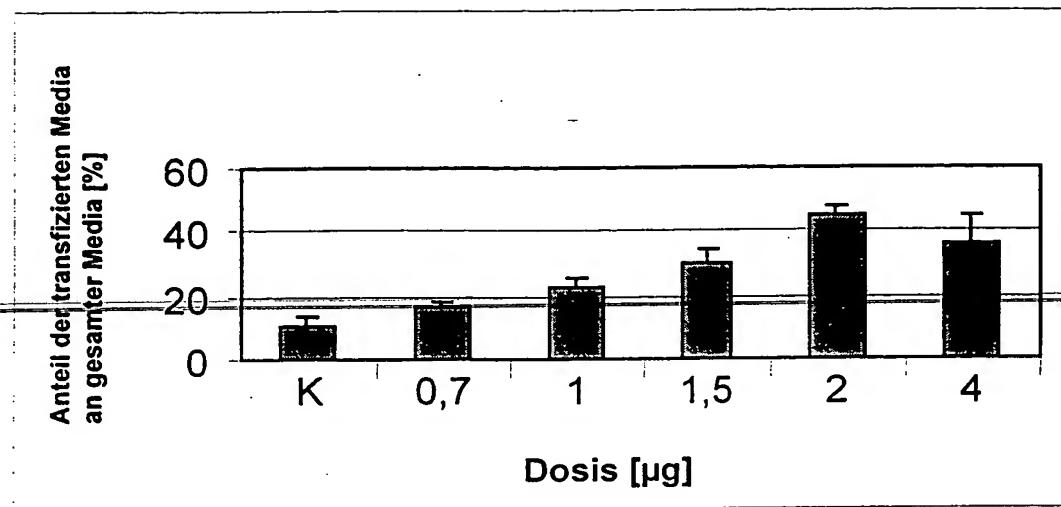


Fig. 8A

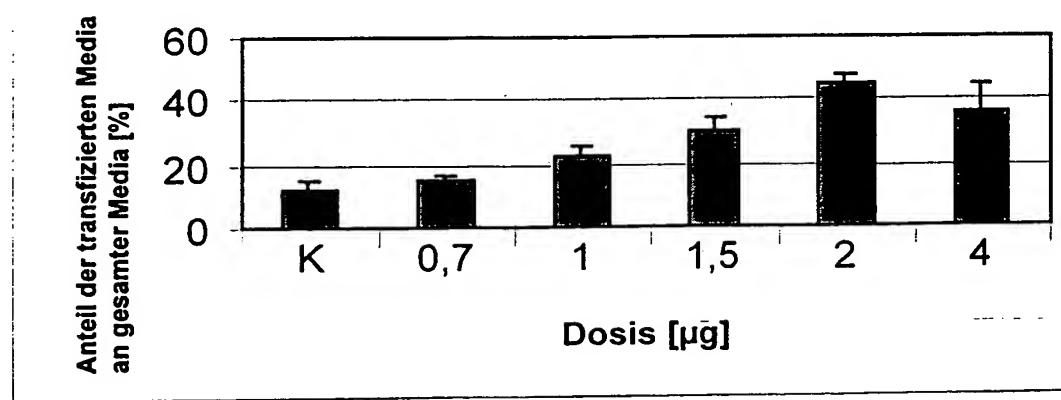


Fig. 8B